UNIVERSITE DE PARIS

FACULTE DE PHARMACIE

Année 1967-68 Série U N° 456

THESE

présentée à la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Paris
pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Paris
(Mention Pharmacie)

par

Barbara Niemann

soutenue le 22.3.1968

Contribution à l'étude comparée des lysozymes.

Jury: M.M. J.E. COURTOIS Président
M. GIRARD
F. PERCHERON } Examinateurs
P. JOLLES

UNIVERSITE DE PARIS

FACULTE DE PHARMACIE

Année 1967-68 Série U N° 456

THESE

présentée à la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Paris
pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université de Paris
(Mention Pharmacie)

par

Barbara Niemann

soutenue le 22.3.1968

Contribution à l'étude comparée des lysozymes.

Jury: M.M. J.E. COURTOIS Président
M. GIRARD
F. PERCHERON } Examinateurs
P. JOLLES

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEINEN ELTERN GEWIDMET

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523704_0090

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Biologique, 96, bd. Raspail, Paris 6e. Il a été rendu matériellement possible grâce à l'aide reçue successivement par le U.S. Department of Agriculture, grant number FG-FR-112 (septembre 1965 - août 1966); par Hoffmann-La Roche, Bâle (septembre 1966 - décembre 1966); par l'intergroupe Cancer-Leucémie, I.N.S.E.R.M., Paris (janvier 1967 - août 1967) et par la Stiftung Mitbestimmung, Volkswagenwerk-Stipendien, Düsseldorf (septembre 1967 - mars 1968).

J'exprime ma respectueuse reconnaissance à Mr. le Professeur J.E. Courtois, qui a bien voulu présider le jury, ainsi que Mrs M. Girard, F. Percheron et P. Jollès qui ont accepté d'être mes examinateurs.

Je tiens tout particulièrement à présenter mes sincères remerciements à Mr. P. Jollès, Directeur de Recherches au C.N.R.S., pour la direction et l'intérêt qu'il a portés à cette étude.

Ma reconnaissance va également à Mme J. Jollès pour l'aide qu'elle m'a accordée surtout en ce qui concerne la troisième partie de la présente étude.

Enfin, j'exprime mes vifs remerciements à mes collègues de laboratoire ainsi qu'à Mr J. Vasserot, qui m'ont appris le français avec beaucoup de patience et m'ont constamment soutenu de leurs conseils.

PERSONNEL DE LA FACULTE

DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MALANGEAU P.	DOYEN
GUILLOT M.	Assesseur
DELAVEAU P.	Assesseur
RODINEAU L.	Secrétaire Général
FERRARI (Mme S.)	Attaché Principale
JEANDEL L	Attaché
ESPINASSE (Mme M.-L.)	Attaché
BRENN A.	Attaché
JACOB A.	Attaché
MUR (Mme A.-M.)	Attaché
FRIZOL (Mle E.)	Attaché
TRICAN J.	Attaché

PROFESSEURS HONORAIRES

LAUNOY L.
FLEURY P.
PICON M.

PROFESSEURS

JANOT M.-M. Membre de l'Institut	Pharmacie Galénique (T)
VALETTE G.	Pharmacodynamie (T)
PARIS R.	Matière Médicale (T)
GUILLOT M.	Physique (T)
GAUTIER J.-A.	Chimie Organique (T)

LAMBIN (Mle S.)	Microbiologie(T)
RAOUL Y.	Physiologie (T)
COURTOIS J.	Chimie Biologique (T)
DOMANGE L.	Chimie Générale et Minérale(T
TRUHAUT R.	Toxicologie (T)
MORETTE A.	Hydrologie (T)
CAVIER R.	Parasitologie (T)
QUEVAUVILLER A.	Hygiène et Education Sanitaire (T)
MOREAU R.	Pharmacie Chimique (T)
GERMAN A.	Virologie et Sérologie (T)
PIETTE M.	Biologie Sanguine, Hématologie (T)
MALANGEAU P.	Chimie Analytique (T)
GIRARD M.	Biochimie Appliquée (T)
DILLEMANN G.	Législation, Déontologie et Histologie de la Pharmacie(T
DEYSSON G.	Botanique (T)
MICHEL R.	Endocrinologie (T)
FLAHAUT J.	Minéralogie (T)
RENAULT J.	Chimie Organique (T)
LE HIR A.	Pharmacie Galénique (T)
BOUDENE C.	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
DELAVEAU P.	Matière Médicale et Séméiolo
LARUELLE P.	Physique
ROSSIGNOL P.	Pharmacodynamie
MANGEOT A.	Pharmacie Galénique Industrielle
COHEN Y.	Pharmacodynamie
RENAULT H.	Physique
BOURDON R.	Chimie Analytique
REYNAUD P.	Pharmacie Chimique
LE MOAN R.	Toxicologie
POISSON J.	Pharmacie Galénique
LECLERC M.	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

PAOLETTI C.	Toxicologie
DESVIGNES A.	Cryptogamie et Technique Bactériologique
PERCHERON F.	Chimie Biologique
SAVEL J.	Biologie Animale
BORY M.	Microbiologie
MIOCQUE M.	Chimie Organique
GUIGNARD J.L.	Botanique Générale
GOUNELLE J.C.	Physiologie
BINET P.	Biologie Animale
COMBET-FARNOUX C.	Chimie Organique
PLAT (Mme M)	Législation et Déontologie Pharmaceutique
DELACOUX E.	Pharmacie Chimique
ADOLPHE C.	Physique
GUERNET M.	Chimie Analytique et Bromatolo
DIDRY J.	Mathématiques
KHODADAD P.	Chimie Minérale et Minéralogie
PERLES R. (F.F.)	Chimie Biologique
YONGER J. (F.F.)	Chimie Analytique
RIVET J. (F.F.)	Chimie Générale et Minérale
HAZEBROUCQ (F.F)	Physique
ETIENNE J. (F.F.)	Mathématiques
MESTRE J. (F.F)	Botanique
BOURRINET P. (F.F.)	Hygiène et Education Sanitaire
SOULEAU Ch. (F.F.)	Chimie Générale et Minérale

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

AGNERAY J.	Chimie Biologique
ASTIN C. (F.F.)	Physique
BLANC (Mme J.)	Chimie Organique
BARNIER (Mme S.)	Mathématiques

BESANCON (F.F.)	Mathématiques
Bournique (Mle C.) (F.F.)	Physiologie végétale
BERNARD (Mle J.)	T.P. Microbiologie 4ème Année
BIGET (Mme M.-P.)	Mathématiques
CARLIER A.	C.E.S. Pharmacie Galénique Industrielle
CENAC (Mme J.) (F.F.)	C.E.S. Parasitologie Pharmaceutique et Technique
CHARPENTIER (Mme M.)	Chimie Préparation
CHOIX (Mle M.)	Pharmacie Galénique
CLAIR (Mle G.) (F.F.)	Essais des Médicaments Végétaux
DAGRON C.	Chimie Organique
DELCOURT A.	Botanique
COMPAGNON P. (F.F.)	Chimie Organique
DAVY J. (Mme) (F.F.)	C.E.S. Biochimie
DECAUDIN (Mle M T.)	Parasitologie
DREUX C.	C.E.S. Electrochimie Appliquée à l'Analyse
DUMANT (Mle G.)	C.E.S. Contrôle des Médicaments (Physico-Chimie)
DUPONT (Mme C.)	Pharmacodynamie
ETIENNE G.	Pharmacie Galénique
FLEURY (Mle S)	E.D. Chimie Analytique
FOGLIETTI (Mle M.J.)	Chimie Biologique
GOURSAT (Mle M.J.) (F.F.)	Botanique
GAYRAL P. (F.F.)	T.P. Zoologie
HAMON M.	Chimie Analytique
HARIPSE J.	Chimie Organique
HENRY J.	Chimie
HUBERT (Mme J.)	C.E.S. Bactériologie Pharmaceutique et Technique
JUND (Mle Y.)	C.E.S. Immunologie Générale et Appliquée
JULIEN R. (F.F)	Chimie Minérale 1ère Année
LAROCHE J.	Physique
LEBOEUF M. (F.F.)	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique
LEGER (Mme N.)	Parasitologie

LAIEGERIE P. (F.F.)	C.E S. Biochimie
LE DUC (Mme Y.)	T.P. 4ème Année
LEIUC R.	Microbiologie
LEMONNIER A	Chimie Analytique
LEVILLAIN P.	Chimie Analytique
LIKFORMAN J.	Physique
LONGEVIALE (Mle M)	Botanique
MACCARIO J. (F.F.)	Mathématiques
MANDEREAU J.	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galénique
MANUZIER J. (F.F.)	Chimie Analytique
MARTIN-FRERE H.	Chimie Générale et Minérale 1ère Année
MICHELET A. (F.F.)	Chimie Minérale
MORIN (Mle H.)	C.E.S. Pharmacodynamie et essais biologiques des Médicaments
MOULIN P. (F.F)	Physique
NOTTEGHEM (Mme M) (F.F.)	Zoologie
NGUYEN PHU LICH (F.F.)	C.E.S. Toxicologie et Etudes Sanitaires
PARIS M.	C E.S Analyse Appliquée au Contrôle des Médicaments (Biologie)
PESTIS J	Biologie Animale
POULLAIN P.	C.E.S. Hématologie
PRAT (Mme M T.)	Mathématiques
RODIER N. (F.F.)	Physique
ROLLEN (Mle A.)	Botanique
ROUSSELET (Mle R.)	Essais des Drogues Végétales
ROBERT (Mme M.)	C.E S Immunologie Générale et Appliquée
ROUSSELET F.	Biochimie Appliquée
SEILLER (Mme M.) (F.F.)	Pharmacie Galénique Industrielle
STRUFLER (Mle N.)	Chimie Générale et Minérale
TRUONG CONG TRIEU	Chimie Analytique
TROUPEL (Mme S) (F.F.)	Chimie
VIERFOND J.M. (F.F.)	E.D. Chimie Organique
VILLERS J. (F.F.)	Physique

BIBLIOTHEQUE

RUYSSEN (Mle Y.)	Conservateur en Chef
LAVAUD (Mle S.)	Conservateur
DESGRIPPES (Mme A.)	Conservateur
BOUVRESSE (Mle A.M.)	Bibliothécaire

INTRODUCTION

C'est Fleming qui a découvert en 1921/22 dans le mucus nasal humain un enzyme lysant, appelé lysozyme (EC. 3.2.1.17). Il s'est révélé actif vis-à-vis d'un certain nombre de bactéries dont Micrococcus lysodeikticus est le représentant classique (1). Fleming lui-même et à sa suite beaucoup d'autres chercheurs ont caractérisé les lysozymes non seulement dans la plupart des secrétions et des tissus d'origine humaine, mais encore chez la plupart des vertébrés, chez quelques invertébrés, plantes, bactéries et phages. Le lysozyme le plus étudié a été le lysozyme de blanc d'oeuf de poule. En effet, on peut obtenir cet enzyme assez facilement en grande quantité à l'état cristallisé (2,3) et chromatographiquement pur (4) et, de plus, il est stable. La structure chimique développée (5,6,7) ainsi que la disposition de ses quatre ponts disulfures (8,9,10) ont été établies et un modèle dans l'espace a été élaboré (11); les relations existant entre la structure chimique et l'activité biologique ont été étudiés en détail (12,13), la spécificité vis-à-vis des substrats de haut et de faible poids moléculaire (14,15), le mécanisme d'action (16,17), son comportement vis-à-vis d'inhibiteurs (17,18) ont fait l'objet de nombreuses recherches. Pour toutes ces raisons le lysozyme de blanc d'oeuf de poule constitue une excellente substance de référence dans l'étude comparée des lysozymes (Revues générales: 12,19,20).

Si la présence de lysozyme a été soupçonnée ou même démontrée dans un très grand nombre de tissus, d'organes, etc.(21), un petit nombre seulement de ces enzymes lysants a été obtenu à

l'état chromatographiquement pur; la plupart d'entre eux ont été décrits par le groupe de Jollès (20,22). Parmi ces lysozymes il faut mentionner :

1) les lysozymes d'origine humaine (lait (23,24); salive (25); larmes (24); placenta (26); serum et leucocytes normaux (27); serum et leucocytes de malades atteints de leucémie myéloïde chronique (L.M.C.)* (27); urine de malades atteints de leucémie aigüe myéloblastique (28));

2) les lysozymes de blanc d'oeuf d'oiseaux (cane (29,30); oie (31); pintade (32);

3) quelques lysozymes de vertébrés (chien (33); lapin (34); rat (35));

4) un lysozyme d'invertébré (36,37);

5) quelques lysozymes de bactéries (38,39) et de phages (40,41);

6) un lysozyme de plante (Papaya latex (42)).

Les compositions quantitatives en acides aminés de la plupart de ces enzymes ont été établies (20,22) et quelques éléments de leurs structures chimiques ainsi qu'un certain nombre de leurs propriétés ont été étudiés (12,20,24,30,43,44, 45); acides aminés N- et C-terminaux, hydrolysats trypsique et chymotrypsique, stabilité à la chaleur, spécificité, mécanisme d'action.

Toutes ces recherches ont rendu possibles les constatations suivantes :

1)- les lysozymes extraits d'espèces animales différentes sont différents, même s'ils proviennent de la même

---

*Lysozyme L.M.C. = lysozyme provenant des leucocytes de malades atteints de leucémie myéloïde chronique.

sécrétion ou du même tissu; les différences peuvent être faibles (lysozymes de blanc d'oeuf de poule et de cane: structures et autres propriétés assez voisines) ou très importantes (lysozymes de blanc d'oeuf de poule et d'oie: spécificités différentes, stabilité différente, structures très différentes);

2)- Les lysozymes contenus dans deux organes, tissus ou sécrétions différents d'un même animal peuvent être différents (lysozymes de blanc d'oeuf et de poumon de poule; de rate et de rein de chien) ou semblables et probablement identiques (lysozymes d'origine humaine : lait, salive, placenta, leucocytes, serum, larmes);

3)- si d'un même organe ou d'une même sécrétion deux lysozymes sont extraits, ils peuvent avoir la même composition en acides aminés (lysozymes de rate de lapin I et II; deux pics dans la plupart des lysozymes humains normaux) : il s'agit sans doute d'une simple différence du nombre de groupements amidés, ce qui expliquerait le comportement chromatographique légèrement différent; mais ces lysozymes peuvent aussi avoir des compositions très légèrement différentes entraînant des différences dans leurs structures chimiques (lysozymes de blanc d'oeuf de cane II et III).

Ces considérations nous ont guidés dans le choix de nos recherches. Celles-ci se sont portées dans trois directions différentes ayant toutes trait à la biochimie comparée des lysozymes.

1. Nous avons tout d'abord essayé de découvrir une source de lysozyme abondante, très différente des lysozymes de vertébrés étudiés jusqu'ici : notre choix s'est porté sur les

invertébrés. Des études antérieures effectuées au laboratoire (36) avaient montré pour la première fois que certains invertébrés contenaient un lysozyme, en particulier les Annélides (Nephthys hombergi). La recherche de tels lysozymes a été étendue à un grand nombre d'invertébrés.

2. Bien que provenant de sécrétions ou de tissus différents, tous les lysozymes d'origine humaine étudiés jusqu'à présent avaient la même composition en acides aminés; même les lysozymes provenant des leucocytes de malades atteints de leucémie myéloïde chronique (L.M.C.) n'échappaient pas à cette règle (27). Les travaux récents effectués avec les lysozymes contenus dans le blanc d'oeuf de cane (30) ont permis de caractériser des différences de structure en dépit d'analyses très voisines sinon identiques. Mais il faut rappeler ici que même avec les techniques analytiques actuelles très fines (Autoanalyseur), la composition d'une protéine ne peut être définitivement connue qu'après des travaux concernant sa structure. Il nous a donc paru intéressant de faire appel à des techniques électrophorétiques (électrophorèse en gel d'acrylamide) en vue de mettre en évidence éventuellement des différences entre le lysozyme des leucocytes "normaux" et le lysozyme des leucocytes L.M.C.

3. Dans un troisième temps, nous avons essayé de comparer les structures chimiques de deux lysozymes assez voisins: les lysozymes de blanc d'oeuf de poule et de cane II et III. Nos comparaisons ont eu pour objet les peptides obtenus par hydrolyse chymotrypsique : des recherches antérieures effectuées au laboratoire avaient en effet abouti à l'établissement de la structure chimique développée du lysozyme de blanc d'oeuf de poule (5,6,8). L'étude de l'hydrolysat chymotrypsique du lysozyme de cane II et III constitue une étape importante au cours de la détermination de la structure de cette protéine.

Les trois études dont nous venons de définir la raison d'être et qui constituent une contribution à l'étude comparée des lysozymes, entreprise au laboratoire, feront l'objet de la deuxième partie de cette thèse, la première partie étant consacrée à un rapide exposé des méthodes que nous avons employées.

METHODES

I. METHODES UTILISEES AU COURS DE L'ETUDE DU LYSOZYME DES INVERTEBRES.

A) Conservation des animaux.

Les animaux sont conservés à 0° dans l'acétone R.P. contenant 1% d'acide acétique; les préparations sont effectuées le plus rapidement possible.

B) Préparation des liquides soumis au dosage de lysozyme.

Les invertébrés sont broyés avec un Ultra Turrax (TP 18/2; Labo-Moderne, Paris) à plusieurs reprises pendant une minute à une vitesse de 24.000 tours/minute. Nous avons employé comme liquide de broyage soit de l'acide acétique 0,1 N, soit une solution de phosphate monosodique à pH 5,1; 0,2 N. Les broyats ont été centrifugés avec une centrifugeuse International (Model PR 2; International Equipment, Mass., USA) à 4°, à une vitesse de 15.000 tours/minute, ou avec une centrifugeuse Christ (Osterode, Harz, Allemagne) à 20°, à une vitesse de 3 - 4.000 tours/minute.

C) Dosage de l'activité lysante.

Tous les dosages turbidimétriques font appel à la propriété que possède chaque lysozyme de lyser une suspension de *M. lysodeikticus* (14,46) en détruisant la paroi de la bactérie. On mesure l'augmentation de la transmission en fonction du temps; on utilise comme témoin une solution standard de lysozyme de blanc d'oeuf de poule (Armour, Kankakee, Ill., USA).

1. Dosage effectué avec les photomètres Meunier, Labospac (Dosage de 2 à 8 ug de lysozyme) (22).

Pour les dosages effectués avec les photomètres Meunier ou Labospac (Jobin et Yvon, Arcueil, France), que nous avons utilisés avec le filtre rouge à 650 mu, 20 mg de poudre acétonique de M. lysodeikticus préparée selon la technique de Fraenkel-Conrat (47) sont dissous dans un mélange de 90 ml d'une solution tampon de phosphates disodique et monopotassique pH 6,2; 0,15 M et de 10 ml d'une solution de chlorure de sodium à 1%. La suspension obtenue présente une densité optique qui correspond au maximum lisible (Meunier: entre les divisions 170 et 190 du tambour; Labospac: entre les divisions 70 et 85 du tambour), l'eau présentant une transmission de 100%, ce qui correspond au zéro du tambour.

Au temps zéro, nous avons ajouté 5 ml de la suspension bactérienne , entre 0,01 et 0,5 ml de la solution de lysozyme à analyser, placée dans la cuve du photomètre. Nous avons mesuré l'activité de la solution en suivant le déplacement d'un spot: nous avons noté le temps en secondes correspondant à une augmentation de transmission pour 4 fois 5 divisions du tambour du photomètre Meunier et pour 4 fois 2 divisions du tambour du photomètre Labospac. L'activité de la solution est inversement proportionnelle à ce temps. Pour chaque série de mesures, nous avons établi une courbe étalon des valeurs de l'activité obtenue pour diverses concentrations connues de lysozyme de blanc d'oeuf de poule.

2. Dosage effectué avec le photomètre Beckman.

Pour les dosages effectués avec le spectrophotomètre Beckman DU, nous avons préparé une suspension de M. lysodeikticus (environ 6 mg) dans une solution d'acétate d'ammonium 0,1 M de façon à obtenir une absorption de 1,200 à 1,250 à 700 mμ. Pour établir la courbe étalon avec le lysozyme de poule, nous avons ajouté des quantités variables de cet enzyme à la suspension et mesuré la diminution de l'absorption après différents intervalles de temps (15, 30, 45 secondes; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 minutes). Les dosages durent très longtemps, mais si l'éclaircissement de la suspension est régulier , on ne peut plus douter d'être en présence d'un lysozyme. Nous avons utilisé cette méthode dans le cas de certains invertébrés, lorsque nous n'étions pas sûrs d'être en présence d'un lysozyme.

3. Dosage effectué avec le photomètre Vitatron.

Avec le photomètre Vitatron (UR 100; Dieren, Pays-Bas), on a effectué le dosage de l'activité lysante de la façon suivante: 30 mg de cellules de M. lysodeikticus (Miles Laboratories, Elkhardt, Ind. USA) sont dissous dans 90 ml de solution tampon de phosphates pH 6,2; 0,065 M et 10 ml d'une solution de chlorure de sodium à 1%. On met dans la cuve 2,5 ml de la suspension et 0,8 ml d'une solution aqueuse contenant de 0 à 10 μg de lysozyme de poule. L'éclaircissement de la suspension à 583 mu est enregistré automatiquement. Les comparaisons avec une solution inconnue sont donc aisées. Nous avons utilisé le photomètre Vitatron dans le cas de solutions très colorées obtenues après broyage de certains invertébrés.

4. Microdosage (de 0,1 à 1,2 µg de lysozyme) (22,48).

La suspension pour les microdosages est préparée de la manière suivante: 100 mg de substrat bactérien de lysozyme ("Bacto-lysozyme-substrate" des Laboratoires DIFCO, Detroit, Mich., USA) sont dissous dans 45 ml de solution tampon de phosphates pH 6,2; 0,15 M et dans 5 ml d'une solution de chlorure de sodium à 1%; cette solution présente une transmission de 30% ($\pm$ 5%) à 540 mµ en utilisant un spectrophotomètre Coleman Junior (Maywood, Ill., USA); l'eau présente dans ces conditions une transmission de 100%. A 30 ml de cette suspension, on ajoute soit 0,2 ml à 1,2 µg de lysozyme, soit des prélèvements de solutions à doser. On réajuste le volume dans chaque cas à 6 ml. Après agitation, les suspensions sont lues tout de suite et de nouveau après une incubation de 35 minutes dans une étuve à 37°. L'augmentation de la transmission est proportionnelle à la quantité de lysozyme. L'activité lysante est calculée d'après une gamme établie avec le lysozyme de poule. On emploie ce dosage pour des quantités de lysozyme très faibles, entre 0,2 et 1,2 µg pour 3 ml.

5. Préparation d'un extrait riche en lysozyme.

Le mode de préparation est le suivant: broyage (solution de phosphate monosodique pH 5,7; 0,05 M); adsorption sur Amberlite CG-50 pH 6,5; élution avec une solution tampon de phosphates pH 6,5; 0,8 M; courte dialyse, dessalification sur Sephadex G-75 ou G-25.

II. METHODES UTILISEES AU COURS DE L'ETUDE DU LYSOZYME DES LEUCOCYTES NORMAUX (N) ET DES LEUCOCYTES DE MALADES ATTEINTS DE LEUCEMIE MYOLOIDE CHRONIQUE (L.M.C.).

A) Obtention des leucocytes (49,50).

Les leucocytes sont préparés selon le procédé décrit par Maupin et Chary (49,50) à partir de tapis leucocyto-plaquettaires regroupés. Ceux-ci subissent une centrifugation (13 minutes) et une fragmentation en pipette conique. La purée leucocytaire obtenue est lavée deux ou trois fois en milieu physiologique (sédimentation paradoxale) et éventuellement centrifugée (35 secondes).

B) Obtention d'un extrait riche en lysozyme (51).

Les leucocytes sont broyés avec un Ultra Turrax soit dans une solution tampon de phosphates pH 6,98; 0,05 M, soit dans de l'acide acétique 0,1 N, soit dans l'eau. Les broyats sont centrifugés avec une centrifugeuse International à 4°, à 4.600 tours/minute, pendant 15 minutes à une heure. A pH 3,5 (acide acétique 0,1 N) nous avons chauffé les solutions avec succès, c'est-à-dire sans perte de l'activité lysante, dans les conditions suivantes: bain-marie bouillant pendant une minute, puis refroidissement immédiat dans un bain de glace.

C) Chromatographie d'équilibre (51).

1. Préparation de la résine: régénération, solutions tampons.

Nous avons travaillé avec l'Amberlite CG-50 type II, 200-400 mesh, qui est une résine échangeuse de cations, dont le

groupement actif est un groupement carboxylique. Elle a été régénérée par des lavages successifs avec: NaOH 0,2 N (jusqu'à pH 14); H_2O; HCl N (jusqu'à pH 1); H_2O; NaOH 0,2 N (jusqu'à pH 14); H_2O. Pour l'ajustement approximatif du pH de la résine, on la sèche sur Büchner, puis on la suspend dans de l'eau en ajoutant de l'acide chlorhydrique 2 N jusqu'à obtention du pH voulu. On laisse reposer cette suspension; la résine est à nouveau séchée sur Büchner; enfin elle est suspendue dans une solution tampon, par exemple pH 6,98; 0,2 N. Cette opération doit être répétée jusqu'à ce que le pH soit tout à fait stable.

2. Colonne.

La résine est mise en suspension dans peu de solution tampon, puis elle est introduite dans une colonne par fractions de 20 cm de hauteur. Avant d'ajouter une nouvelle quantité de résine, on attend que la fraction précédente soit tassée. En général, le pH de la solution tampon ne reste pas stable après cette opération et il faut laver la résine en colonne avec la solution tampon jusqu'à ce que l'éluat soit au pH désiré. Nous avons employé pour la chromatographie des leucocytes des colonnes de 56 x 1,8 cm et de 28,5 x 1,2 cm sur lesquelles nous avons chargé au maximum respectivement 2 et 7 ml de liquide enrichi en lysozyme. Il faut noter ici que le pH et la molarité de la solution tampon, la température et la vitesse doivent rester constants tout au long d'une chromatographie d'équilibre.

3. Marche de la chromatographie.

On charge la colonne avec précaution et très lentement, si possible avec une micropipette. La charge doit entrer très lentement, c'est-à-dire que la vitesse d'écoulement doit être d'une goutte toutes les 30 secondes. Il est préférable de ne faire qu'un petit rinçage, au maximum un dixième du volume du liquide de la charge. La vitesse d'une chromatographie d'équilibre est au début de 5 ml par heure (1 goutte/40 secondes); puis elle peut s'accélérer un peu. Les fractions peuvent être d'un volume de 1 à 5 ml et sont recueillies par un collecteur de fractions; elles sont mises au froid le plus vite possible.

4. Repérage des pics.

a. Activité (22,46).

On soumet chaque troisième fraction à un dosage de l'activité lysante en travaillant avec le photomètre Labospac (voir C).

b. Protéines.

Ninhydrine (52). Lorsque la concentration en lysozyme est trop faible pour des dosages d'activité ou lorsque le lysozyme est désactivé, on peut soumettre 0,3 ml d'une fraction à une hydrolyse alcaline et doser les acides aminés ainsi libérés par la ninhydrine (voir III).

Lecture à 280 mμ. Comme troisième méthode de repérage du lysozyme, on peut déterminer l'absorption des fractions à 280 mμ avec un spectrophotomètre Beckman.

D) Caractérisation des pics actifs.

1. Dessalage sur Sephadex.

a. Théorie (53).

Le Sephadex (Pharmacia, Uppsala, Suède) est un dextran modifié obtenu par réticulation de macromolécules linéaires qui forment un réseau à trois dimensions en chaînes polysaccharides. Dans une colonne remplie de gel gonflé, les petites molécules se déplacent dans l'eau ou le milieu tampon se trouvant à l'intérieur comme à l'extérieur du gel. Les grandes molécules ne peuvent pénétrer dans les grains de gel et peuvent seulement circuler à l'extérieur des grains de gel, c'est-à-dire qu'elles traversent le gel dans la phase liquide extérieure aux grains de gel. Les molécules plus petites, par contre, pénètrent dans les grains de gel dans une proportion qui dépend de leur forme et de leur taille. Les molécules sont donc éluées d'une colonne de Sephadex dans l'ordre des poids moléculaires décroissant, ce que l'on appelle l'effet de "tamis moléculaire". Quand les plus petites molécules, c'est-à-dire les sels inorganiques ont été éluées, la colonne est prête pour une autre séparation. Le Sephadex G-25 exclut les molécules d'un poids moléculaire supérieur à 5000.

b. Colonne.

Le Sephadex sec doit être mis en suspension pendant une nuit dans une quantité suffisante d'eau de façon à ce que, après sédimentation, le volume en excès soit environ 10 fois celui du gel gonflé. Pour obtenir de bonnes séparations, le remplissage doit être exécuté avec soin. Le gel gonflé et décanté est mélangé

avec une quantité d'eau suffisante pour éviter que des bulles d'air subsistent dans le mélange. On remplit alors la colonne qui doit être verticale, avec la résine. Dès qu'une couche de quelques centimètres s'est déposée, on ajoute à nouveau de la résine. Pour stabiliser la colonne, il faut laisser couler l'éluant choisi (de l'acide acétique 0,1 N ou de l'eau) pendant plusieurs heures.

c. Marche à suivre.

L'élution se fait avec de l'acide acétique 0,1 N ou de l'eau. On repère les fractions actives par un dosage de l'activité lysante; on vérifie que le pic actif est dessalifié en amenant à sec 0,2 ml de chaque fraction ou en ajoutant un réactif inorganique à 0,1 ml de chaque fraction. (Pour les solutions de phosphate de sodium 0,2 ml d'une solution de nitrate d'argent à 1%, et pour les solutions de sulfate d'ammonium une solution de chlorure de baryum à 1%).

d. Concentration.

Les fractions actives et dessalifiées sont concentrées soit par lyophilisation (Micro-sublimateur Usifroid, MS 32-4; Usifroid, Boulogne, France), soit dans un dessiccateur sous vide (sur anhydride phosphorique ou soude). Pour un lysozyme très concentré et purifié, la deuxième méthode est préférable, pourvu que le volume de la solution ne soit pas trop grand.

2. Analyse des acides aminés (54) (Voir III).

Pour caractériser les différents pics, une partie aliquote (200-500 µg de substance; quantité exprimée en activité

lysante) est soumise à une hydrolyse acide totale avec HCl 6 N (redistillé) en tube scellé à 110° pendant 18 et 48 heures; la composition en acides aminés est ensuite déterminée à l'aide d'un Autoanalyseur Technicon.

3. Gel d'acrylamide (55).

La colonne de gel de polyacrylamide est réalisée à l'aide d'un tube de verre cylindrique (Canalco, Bethesda, Md.). Elle est composée de trois couches: "lower gel A", "lower gel B" et "upper gel". L'électrophorèse est généralement faite dans une position verticale. L'appareil est mis en marche lorsque le tube contenant le gel avec les protéines et les réservoirs de solution tampon (tampon tris pH 7,7; 0,048 M) sont agencés. Le voltage est appliqué de 45 à 120 minutes (13 v/cm; 50 mA). Le gel est retiré et placé dans une solution d'amido Schwarz à 1%. Pour décolorer les bandes, celles-ci sont lavées, puis conservées dans une solution convenable (acide acétique 7%).

4. Cellogel (29).

L'électrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose gélatineuse (Cellogel) a été effectuée avec un appareil Spetelec (Paris). On fait pénétrer la protéine (entre 500 et 700 µg , quantité déterminée par un dosage de l'activité lysante) sur la bande à l'aide d'une petite lame ou d'une micropipette. Nous avons utilisé des bandes d'une largeur de 2 cm. L'électrophorèse est effectuée dans les conditions suivantes : 15 v/cm; 4 mA; 90-120 minutes; solution tampon d'acétate de sodium pH 4,5; 0,05 N. Les bandes sont colorées avec une solution alcoolique d'amido Schwarz 0,2% et décolorées dans un bain décolorant à base de diacétone-alcool (350 ml méthanol; 500 ml eau; 100 ml diacétone-alcool; 70 ml acide acétique).

III. METHODES UTILISEES AU COURS DE L'ETUDE DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE DU LYSOZYME DE CANE.

A) Réduction du lysozyme.

1. Réduction avec de l'acide thioglycolique et alkylation avec de l'acide iodacétique (56) (voir fig. 1).

On laisse réagir une mole de lysozyme avec 400 moles d'acide thioglycolique dans une solution d'urée 8 M pendant 6 heures à 20°. Le pH est ajusté à 8,5 avec de la triméthylamine fraîche et diluée (1 à 4). Les ponts disulfures sont rompus et les quatre résidus de cystine transformés en huit demi-résidus de cystéine labile: ils sont stabilisés sous la forme de S-carboxyméthylcystéine par addition immédiate d'acide iodacétique (700 moles). Puis on ramène le pH à 8,5 et on laisse réagir pendant deux heures. On dialyse contre de l'eau distillée pendant 48 heures. Par des analyses on vérifie que la cystine a bien été transformée en S-carboxyméthylcystéine et que ni la tyrosine ni le tryptophane n'ont subi de transformation.

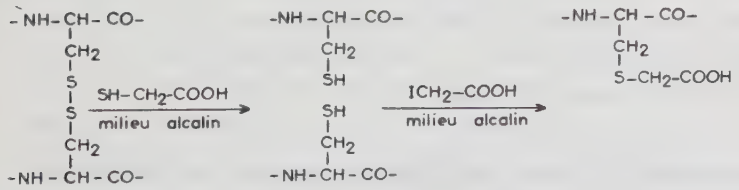


Figure 1

Réduction de la cystine avec l'acide thioglycolique et alkylation

2. Réduction avec le mercaptoéthanol.

Au lieu d'acide thioglycolique on peut employer le mercaptoéthanol (400 moles pour une mole de lysozyme). Le pH est maintenu à 8,5 grâce à l'addition de triméthylamine. Cette méthode habituellement permet une transformation plus complète des ponts disulfures en résidus de S-carboxyméthylcystéine. L'excès de réactif est éliminé en précipitant par un mélange acétone; HCl N (39:1, v/v) le produit de réaction. Le précipité est lavé successivement trois fois par ce mélange et trois fois par de l'éther. Ensuite on dialyse contre de l'eau pendant 48 heures.

B) Hydrolyse chymotrypsique (6).

L'hydrolyse chymotrypsique est effectuée avec de la chymotrypsine Worthington (EC.3.4.4.5) trois fois recristallisée (IGM-CDI 662-65; Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N.J., USA). Le rapport enzyme/substrat est de 1/50 et la concentration en protéine de 1%. Nous avons travaillé en solution aqueuse à pH 7,8 à l'aide de triméthylamine. L'hydrolyse est effectuée pendant 6 heures à 37°. En général, les actions enzymatiques sont stoppées par acidification avec HCl 2 N; mais ce traitement peut être omis si l'on charge l'hydrolysat tout de suite sur la colonne de Dowex 1X2.

C) Séparation de l'hydrolysat chymotrypsique par chromatographie sur Dowex 1X2.

1. Théorie.

Le Dowex 1X2 (57), 200-400 mesh, est un polystyrène réticulé

par le divinylbenzène. Les groupes actifs sont constitués par des restes d'ammonium quaternaire (voir fig. 2).

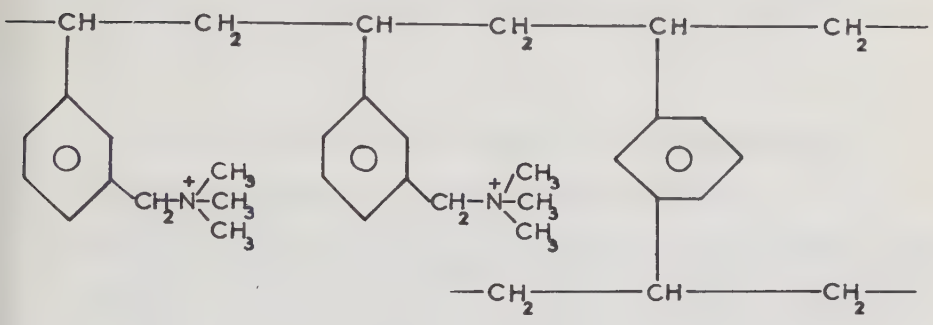
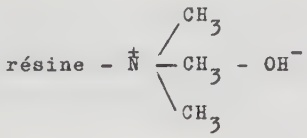


Figure 2

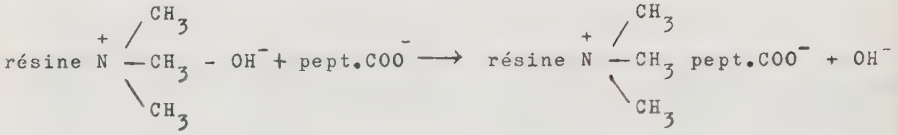
Résine échangeuse d'anions, type Dowex 1X2

Cette résine, en milieu basique, est sous la forme :



Les peptides, en milieu basique, sont sous la forme anionique suivante :

Les peptides pénètrent dans les mailles de la résine et prennent la place des ions OH^-



2. Préparation de la colonne.

On régénère la résine par des lavages successifs avec: H_2O; NH_4OH N (jusqu'à pH 14); H_2O; HCl N (jusqu'à pH 1); H_2O; NH_4OH N (jusqu'à pH 14); H_2O; CH_3COOH N (jusqu'à pH acide); H_2O. Ensuite on tamponne la résine avec une solution tampon de pH 8,4 (solution à 1% de pyridine et à 1% de collidine, ajustée à pH 8,4 avec de l'acide acétique N). On remplit la colonne par fractions de 20 cm, en attendant chaque fois que la résine soit tassée. Toutes nos colonnes avaient pour dimensions 140 x 1,5 cm.

3. Charge de l'hydrolysat.

L'hydrolysat chymotrypsique (10 ml) est chargé sur la colonne avec les précautions habituelles après addition de 0,1 ml pyridine et de 0,1 ml collidine afin de rendre la charge un peu plus basique que la résine.

4. Marche de la chromatographie (58).

Le premier éluant est constitué par la solution tampon qui a servi à équilibrer la résine. Des fractions de 3 ml sont recueillies. Après 120-130 fractions (360-390 ml), un gradient logarithmique a été établi: à une chambre de mélange contenant

500 ml de la solution tampon initiale, on ajoute les acides suivants: acide acétique 0,1 N; 0,5 N; N; 2 N. L'élution de la résine est terminée en faisant couler directement de l'acide acétique 2 N, puis HCl N. Au cours d'une deuxième chromatographie sur Dowex 1X2, nous avons ajouté aux éluants 0,5% de thioglycol pour protéger les ponts disulfures.

5. Repérage des fractions.

Ninhydrine après hydrolyse alcaline.

Les peptides sont détectés avec le réactif à la ninhydrine suivant la méthode de Moore et Stein (52). Une partie aliquote des fractions (ici 0,3 ml) est soumise à l'hydrolyse alcaline pendant deux heures et demie; bain-marie bouillant en ajoutant 1 ml de soude caustique. Après avoir neutralisé (avec 1 ml d'acide acétique à 30%), on ajoute 1 ml de réactif à la ninhydrine. (Quantités pour un dosage: 20 mg ninhydrine; 3 mg hydrindatine; 0,75 ml méthylcellosolve; 0,25 ml solution tampon acétate de sodium pH 5,5; 4 M). On chauffe de nouveau au bain-marie bouillant pendant 15 minutes et on lit la coloration violette à 570 mμ avec un photomètre Coleman Junior après avoir dilué les fractions avec 5 ml d'alcool à 50%.

D) Purification des pics.

Les fractions sont réunies en se référant à la courbe tracée après les dosages à la ninhydrine. Souvent plusieurs peptides sont élués en même temps. On a différents moyens de séparation: la rechromatographie sur colonne, la purification par chromatographie sur papier et la purification par ionophorèse sur papier.

1. Rechromatographie sur colonne de Dowex 50X2.

a. Théorie.

Les Dowex 50 sont des résines échangeuses de cations, fortement acides; ce sont des polymères de styrène et de divinylbenzène qui sont ensuite sulfonés (fig. 3). Le Dowex 50X2 contient 2% de divinylbenzène et possède donc grâce à cet agent de réticulation un système de réseau qui permet aux acides aminés et aux peptides de pénétrer dans les mailles de la résine et de s'échanger avec les cations Na^+.

$$\text{résine } SO_3^-Na^+ + \text{pept.}NH_3^+ \longrightarrow \text{résine } SO_3^- \text{ pept.}NH_3^+ + Na^+$$

b. Cours de la chromatographie.

La régénération de la résine se fait avec: NaOH 0,2 N; H_2O; NaOH 0,2 N; solution tampon pH 5,1; 0,2 N. La résine atteint à ce pH son gonflement maximum. Après avoir rempli la colonne avec de la résine, on lave cette dernière avec de la soude 0,2 N, puis avec la solution tampon voulue. On utilise de petites colonnes (10 x 0,8 cm) et des solutions tampons volatils avec 0,5% thiodiglycol (voir Tabl. I). Les pics sont repérés grâce à un dosage à la ninhydrine effectué après hydrolyse alcaline.

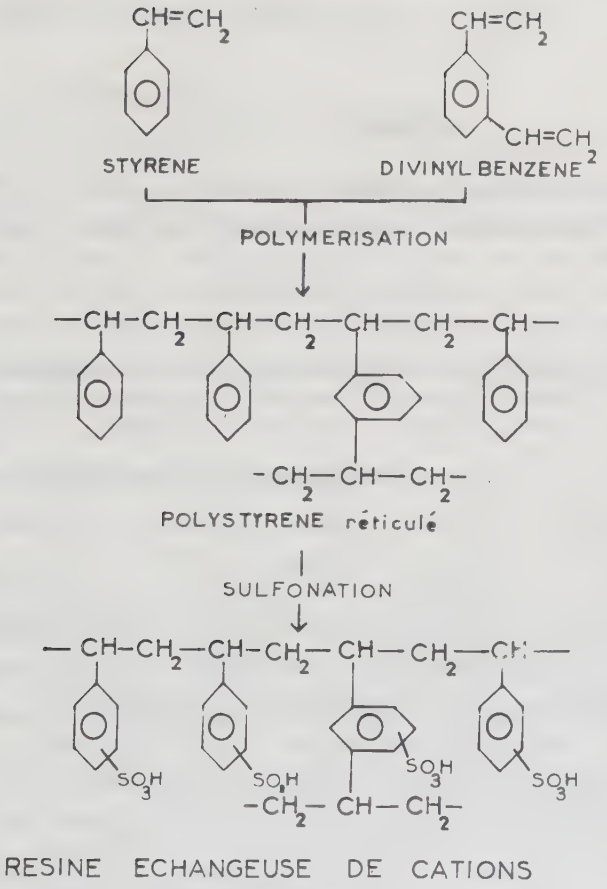


Figure 3

Résine échangeuse de cations, type Dowex 50

Tableau I

Composition des solutions tampons volatils utilisés au cours des chromatographies sur Dowex 50X2

pH	N	Collidine ml	Pyridine ml	Acide acétique ml	Thiodiglycol ml	ajustage du pH avec
2,2	0,2		10	278	5	HCl
3,1	0,2		10	278	5	ac.acét.
5,1	1		80	70	5	ac.acét.
8,3	1	40	40		5	ac.acét.

2. Purification par chromatographie sur papier.

a. Whatman N°1 et N°3.

Des peptides d'un Rf différent se laissent séparer par chromatographie descendante sur papier. On charge la substance correspondant à un mélange de peptides sur la ligne de départ d'une feuille de Whatman N°1 ou Whatman N°3 MM, sur des points distants de 1 cm en même temps que deux points témoins situés de chaque côté du chromatogramme. Les peptides sont séparés dans le solvant n-butanol: acide formique: eau (15:3:2, v/v), 16 à 18 heures, à 20°.

b. Révélation à la ninhydrine.

Pour détecter les peptides, on découpe après séchage les bandes témoins qui sont révélées par le réactif à la ninhydrine. On pulvérise une solution contenant: 1 g de ninhydrine; 40 ml d'acide acétique; 960 ml de n-butanol. Après chauffage à 100°, les peptides paraissent en violet. Pour faire apparaître des peptides qui se voient mal, on peut employer un réactif plus concentré en ninhydrine, constitué de 600 ml d'éthanol absolu, de 900 ml d'acide acétique glacial, de 40 ml de collidine et de 1,5 g de ninhydrine. Après pulvérisation, on sèche à froid.

c. Réactions spécifiques.

Pour détecter l'arginine, nous avons employé le réactif de Sakaguchi, comme indiqué par Acher et Crocker (59). On pulvérise d'abord une solution contenant 10 mg de α-naphtol et 5 g d'urée dans 100 ml d'alcool à 95°, solution rendue alcaline par addition de quelques pastilles de soude; après séchage, on pulvérise une

solution d'hydroxyde de potassium à 5% qui contient 0,7 ml de brome par 100 ml. La coloration apparaît à froid.

On met en évidence le tryptophane avec le réactif de Ehrlich modifié par Dalgliesh (60). Une solution acétonique qui contient pour 100 ml 1 g de p-diméthylaminobenzaldéhyde et 10 ml d'HCl est pulvérisée et la feuille est séchée à froid. Après cinq minutes la coloration rouge pourpre apparaît; elle s'intensifie en un jour pour donner ensuite une coloration bleu foncé.

Pour caractériser la tyrosine, on utilise le réactif de Gerngross comme indiqué par Tonnies et Kolb (61): une solution de 100 mg de α-nitroso-β-naphtol dans 100 ml d'alcool qui est après séchage rendu acide par une solution d'acide nitrique à 10%. La coloration devient apparente après un chauffage de cinq minutes au four.

d. Elution des peptides.

Les bandes correspondant aux différentes taches des points témoins sont découpées et éluées suivant la nature du peptide avec: acide acétique 0,1 N ou N; HCl 0,1 N; ammoniaque 0,1 N.

3. Purification par ionophorèse sur papier (6).

Après un essai préliminaire qui avait pour but de démontrer que la séparation du mélange de peptides était possible par ionophorèse sur papier, on peut procéder aussi à une ionophorèse préparative sur papier. On dissout les peptides dans l'acide acétique N et on dispose cette solution sur une feuille de papier Whatman N°1 (140 x 35 cm) en même temps que deux points témoins. On peut utiliser un Phérographe (Original Francfort, L. Hormuth, Wiesloch, Allemagne) en travaillant avec 37,5 V/cm,

pendant 1 à 2 heures, à différents pH :
pH 6,5 (pyridine : acide acétique : eau; 20:1:979, v/v)
pH 3,5 (pyridine : acide acétique : eau; 2:20:978, v/v).
Les points témoins sont révélés par le réactif à la ninhydrine et les bandes ayant la même mobilité que les peptides ainsi mis en évidence sont découpées et éluées (voir 3, d).

E) Analyse des peptides : Autoanalyseur (54).

Nos analyses ont été faites à l'aide d'un Autoanalyseur Technicon (Chromatography Corp., Chauncey, N.Y., USA). Les colonnes ont une dimension de 75 x 0,9 cm, et elles sont remplies avec une résine spéciale Technichon, chromobead, Type A, B ou C, tamponnées à pH 3,10; 0,20 M. L'hydrolysat amené à sec est repris avec 0,5 ml de la solution tampon pH 3,1 et chargé sur la colonne, l'eau de la jaquette étant maintenue à 60°. L'élution des acides aminés est obtenue par application d'un gradient avec augmentation croissante du pH et de la molarité des solutions tampons (Tabl. II et III). La détermination des acides aminés après réaction avec la ninhydrine est faite à deux longueurs d'onde à 570 mμ et pour la proline à 440 mμ grâce à deux colorimètres. Les résultats sont enregistrés automatiquement sous forme de courbe. Les rapports moléculaires des acides aminés sont calculés d'après les surfaces des pics qui sont toujours élués dans le même ordre. La colonne est régénérée en faisant couler de la soude 0,2 N pendant 20 minutes et du tampon pH 3,10 pendant une heure. Les analyses se font en cinq heures et le débit de la colonne est de 0,8 ml par minute.

Tableau II

Composition des solutions tampon pour l'Autoanalyseur Technicon

(quantité pour 1 litre d'eau bouillie)

Tampon à pH	Citrate de Na g	Chlorure de Na g	Méthanol ml	Soude 2 N ml	HCl 6 N ml	Thiodiglycol ml	Brij sol.15% ml
2,75	17,88		100	25	35	5	20
2,875 -3,10	17,88			25	30	5	20
3,80	17,88			25	25	5	20
5,0	17,88	35,07		25	13	5	20
6,10	17,88	58,44				5	20

Tableau III

Composition des chambres de mélange de l'Autograde

Chambre de mélange		ml
1	Tampon pH 2,75	38
	alc.méthyl.	2
2	Tampon pH 2,75	12
	" pH 2,875	28
3	Tampon pH 2,875	40
4 - 5	Tampon pH 3,8	80
6 - 9	Tampon pH 6,1	160

F) Structure des peptides.

1. Détermination de l'enchaînement N-terminal par action de l'aminopeptidase (EC 3.4.1.2) de A. oryzae (62).

L'aminopeptidase (Röhm et Haas, Darmstadt, Allemagne) réagit à 37° et à pH 7,5 sur les peptides et les protéines même natives en détachant l'acide aminé N-terminal et en général aussi la séquence N-terminale. Le pH du mélange réactionnel est contrôlé souvent et maintenu constant avec de la triméthylamine. Le rapport enzyme/substrat est égal à 1/20, la solution aqueuse contenant 0,1 à 0,2 µM de protéine dans 0,5 ml. On emploie des temps très différents selon la nature de l'acide aminé terminal (30 minutes à 24 heures). La réaction est stoppée par acidification.

2. Détermination des acides aminés C-terminaux par action de la carboxypeptidase (EC 3.4.2.1) (6).

L'emploi de la carboxypeptidase Worthington permet de déterminer l'acide aminé C-terminal d'un peptide ou d'une protéine. La réaction se fait à pH 7,8 (triméthylamine) et à 37°, en présence de diisopropylfluorophosphate ($2. 10^{-3}$ M) pour inhiber les traces d'endopeptidase . Pour détacher les acides aminés neutres et acides, on emploie la carboxypeptidase A (EC 3.4.2.1) et pour les acides aminés basiques, la carboxypeptidase B (EC 3.4.2.2). La réaction est arrêtée par acidification.

3. Hydrolyse trypsique (6).

Quelques peptides obtenus par hydrolyse chymotrypsique sont trop longs pour que leur structure puisse être directement établie; ainsi sont-ils soumis à une hydrolyse trypsique.

La trypsine (EC 3.4.4.4) Worthington à 50%, trois fois recristallisée, doit en principe subir un prétraitement: elle est soumise à l'action de HCl 0,0625 N pendant 18 heures à 37° dans une solution à 1% pour détruire les traces de chymotrypsine. Ce traitement peut dans notre cas être négligé. Nous avons employé pour les peptides courts un rapport enzyme/substrat de 1:20 dans une solution de 1 à 2%. L'action enzymatique a lieu entre pH 7,5 et pH 7,8; ce pH est maintenu par addition de triméthylamine. On arrête l'hydrolyse soit en acidifiant soit en amenant la solution à sec.

Les peptides que l'on obtient au cours de cette hydrolyse sont séparés par chromatographie ou ionophorèse sur papier (voir D).

RESULTATS

I. Lysozyme des invertébrés.

Introduction.

Quelques recherches concernant la présence d'un lysozyme chez les invertébrés avaient déjà été effectuées au laboratoire (36); un certain nombre d'animaux appartenant aux groupes des Echinodermes, des Annélides et des Mollusques avaient été étudiés (voir Tableau VI). C'est seulement chez Nephthys hombergi et chez Mytilus edulis qu'il avait été possible de mettre en évidence l'existence d'un lysozyme. Nephthys hombergi en contient 20 mg/kg (quantité exprimée en lysozyme de blanc d'oeuf de poule par un dosage de l'activité lysante); au cours d'une première série d'essais l'enzyme semblait avoir une activité spécifique de 4 à 5 fois supérieure à celle du lysozyme de poule et quelques résultats très partiels concernant sa composition en acides aminés avaient été rapportés (37) (Tableau IV).

Résultats.

Teneur en lysozyme de Nephthys hombergi et résultat de quelques expériences effectuées avec le lysozyme.

Nous avons essayé de préparer une quantité suffisante de ce lysozyme afin de compléter les résultats antérieurs. Les préparations ont cependant plus ou moins échoué. Au fur et à mesure que la purification avançait, l'enzyme était de moins

en moins stable. Aussi avons-nous eu en mains des préparations enzymatiques peu abondantes ayant subi une filtration sur Sephadex G-75 mais non pas une chromatographie d'équilibre. Une partie du produit ainsi obtenu a servi à faire des essais d'électrophorèse sur Cellogel. Ces expériences ont montré que le lysozyme de Nephthys hombergi est moins basique que le lysozyme de blanc d'oeuf de poule. Une autre partie a servi à quelques déterminations analytiques concernant notamment la teneur en acides aminés (voir Tableau IV), mais il faut remarquer à nouveau que la valeur de ces analyses est à discuter puisque le lysozyme n'avait pas subi de purification par chromatographie d'équilibre. De nombreuses préparations effectuées à différentes époques de l'année nous ont permis de constater de grandes différences dans la teneur en lysozyme (voir Tableau V): il semble donc que les invertébrés produisent des quantités différentes de lysozyme au cours de l'année. Si l'on ne prend pas en considération les dosages de l'activité lysante effectués sur un matériel qui a été conservé trop longtemps (valeurs entre parenthèses, Tableau V), on trouve une moyenne de 30 µg de lysozyme/ g d'animal conservé dans l'acétone pour le mois de février, 125 µg/g pour le mois d'avril et 30 µg/g pour le mois de novembre. En outre, on remarque la perte d'une partie de l'activité lysante au cours du stockage.

Recherche systématique d'un lysozyme chez les invertébrés.

Les résultats relativement peu satisfaisants concernant le lysozyme de Nephthys hombergi nous ont incités à faire des recherches systématiques chez les invertébrés (Tableau VI et figure 4) afin de trouver une source de lysozyme plus abondante. Le tableau VI indique les résultats. Dans le phylum des Spongiaires et des Cnidaires, il y a probablement des traces de lysozyme. Chez les Sipunculiens le lysozyme semble être plus

Tableau IV

Données partielles concernant la composition quantitative en acides aminés du lysozyme de Nephthys hombergi (résidus calculés pour un P.M. de 14-15.000)

	Acides aminés connus jusqu'à présent (36,63)	Analyse du 26.7.66	Analyse du 26.9.66	Analyse du 10.67
$CySO_3H$		4,06	5-6	3,23
$MetO_2$		7,2	1	
Asp		10	7-8	6,7
Thr		8,35	6-7	6,17
Ser		9,3	7-8	5,54
Glu	8-9	8	5	6,38
Pro	12	13,5	9	8,96
Gly			16	16,95
Ala			9	11,22
Val			4	3,82
Cys	+			
Met		3,03		
Ileu		2,94	3-4	2,84
Leu		4	3-4	4
Tyr	3	-	-	-
Phe	3	0,81	1	0,92
Lys	12-13	23,8	21	25,6
His	+	4,18	4	3,0
Arg	7	10,8	8	8,24

Tableau V

Activité lysante de Nephthys hombergi au cours de l'année

Date d'envoi	Date de la préparation	Méthode de dosage		µg
		Procédé C.1.(p.10)	Procédé C.4 (p.12)	
Début février 66	9.2. 66	x		12
" "	10.2. 66	x		15
" "	16.2. 66		x	57
" "	16.2. 66	x		37
avril 66	28.4. 66		x	140
"	28.4. 66	x		110
"	26.5. 66	x		(21)
"	1.6. 66			(50)
juin 66	3.10.66	x		(16)
octobre 66	2.11.66	x		14
novembre 66	8.11.66	x		24

( ) Entre parenthèses les préparations stockées longtemps.

Tableau VI

Recherche de lysozyme chez quelques invertébrés (µg de lysozyme exprimé en lysozyme Armour/ g d'animal conservé dans l'acétone)

Nom	Phylum	Dosage de l'activité lysante		
		Micro-dosage µg/g Procédé C.4(p.12)	Meunier/ Labospac µg/g Procédé C.1(p.10)	Spectro-photomètre µg/g Procédé C.2(p.11)
1. Leudosolenia complicata	SPONGIAIRES/Calcaires	10	-	
Clathrina coriacea	"	-	-	
Grantia compressa	"	6	-	-
Pronax plumosus	SPONGIAIRES/Démosponges	30	-	
Ficulina ficus	"	-	-	
Thethya aurantium	"	-	-	
2. Anemonia sulcata	CNIDAIRES/Anthozoaires	3,6	-	
Actinia equina	"	45	-	-
3. Sipunculus nudus	SIPUNCULIENS	15	5,4	
Phascolosoma vulgare	"	10	-	
4. Nereis diversicolor	ANNELIDES/Polychètes	100	-	-
Perinereis cultrifera	" *	17	-	
Nephthys hombergi	" *	21-167	15-30 12-110	actif
Glycera convoluta	" *	28	-	
Scoloplos armiger	"	9,6	-	
Nerine cirratulus	"	570	6,5	actif
Arenicola marina	" *	-	-	
Audouinia tentaculata	"	40	-	
Lanice conchilega	" *		-	
5. Carcinus maenas	ARTHROPODES/Décapodes hémolymphe pattes glandes	- + + + + + + +	+ - - - - - - -	

répandu et les Annelides en ont presque tous. Nous avions espéré en trouver davantage chez Carcinus maenas (crabe), que nous avons examiné en détail, parce que les Crustacés sont assez voisins des Insectes chez lesquels Malke (63) a prétendu avoir décelé cet enzyme; mais le résultat était décevant. Les Mollusques et les Echinodermes, par contre, en sont très riches. Chez aucun des Tuniciers nous n'avons trouvé de lysozyme. L'absence de cet enzyme chez les Céphalochordes dont Amphioxus est le représentant unique dans cette liste, n'est pas significative. Après chaque dosage négatif, nous avons ajouté dans la suspension d'animaux broyés 6 µg d'une solution standard de lysozyme de blanc d'oeuf de poule afin de vérifier que nous n'étions pas en présence d'un inhibiteur. Mais dans aucun cas nous n'en avons trouvé. L'Annélide Nerine cirratulus a eu un comportement étrange: en diluant, l'activité lysante semblait augmenter. Mais en utilisant non plus une, mais plusieurs méthodes de dosage, nous n'avons pas pu confirmer ce résultat.

Discussion.

Les résultats partiels que nous avons obtenus et l'examen des tableaux nous ont amenés à formuler quelques réflexions et à discuter certains points.

1. Le fait que nous n'ayons pas trouvé de lysozyme chez les Tuniciers, phylum très voisin des vertébrés (voir figure 4) et, par contre, beaucoup de lysozyme chez les Annélides, suggère, au stade actuel des recherches, que la présence de lysozyme n'est pas nécessairement le signe d'une évolution plus ou moins grande. Il faut rappeler ici que la plupart des organes, tissus et sécrétions d'origine humaine sont riches en lysozyme.

2. Grâce au tableau VI, nous avons essayé de nous rendre compte si les invertébrés vivant dans une eau ou dans des sables riches en matière organique, c'est-à-dire dans des

milieux très sales, se protègeaient tout au moins en partie contre certaines bactéries et infections à l'aide de lysozyme. D'une manière un peu surprenante, parmi les Polychètes, les Mollusques et les Sipunculiens, ce sont les espèces qui vivent dans les milieux les plus riches en matière organique et les moins oxygénés, qui produisent le moins de lysozyme (Phascolosoma vulgare chez les Sipunculiens; Scoloplos armiger et Audouinia tentaculata chez les Annélides, et Scrobicularia plana chez les Mollusques). A l'intérieur de la famille des Néréidides, par contre, c'est l'espèce qui vit dans le milieu le plus sale (Nereis diversicolor) qui contient le plus de lysozyme. Il faudrait naturellement examiner un nombre beaucoup plus grand d'animaux sur une échelle plus vaste pour pouvoir tirer une conclusion générale.

3. Nos recherches ont permis de déceler une nouvelle source relativement riche en lysozyme: Asterias rubens. La teneur en lysozyme est de l'ordre de 15 mg/kg, teneur d'ailleurs très voisine de celle trouvée chez Nephthys hombergi. Ce sont surtout les caeca digestifs qui en sont très riches.

4. Une des difficultés du travail consacré au lysozyme de Nephthys hombergi est constituée par la grande labilité de l'enzyme. Il est possible, bien que les résultats analytiques soient loin d'être définitifs, que sa faible teneur en cystine en soit la cause. Des travaux récents consacrés par le groupe de Jollès aux lysozymes de cane (29, 30), d'oie (31) et d'origine humaine (23, 24, 27) avaient permis de préciser que la stabilité à la chaleur est fonction du nombre de ponts disulfures: un lysozyme contenant quatre ponts disulfures est plus stable qu'un lysozyme n'en contenant que deux; par contre, l'activité spécifique évolue en sens contraire: lorsque le nombre de ponts disulfures diminue, la molécule est moins repliée, donc plus réactive. Ces considérations nous ont amenés à rappeler dans cette thèse un tableau paru dans une étude comparée des lysozymes (Tableau VII) (44) et nous avons ajouté à la liste des lysozymes celui de Nephthys hombergi, en maintenant les réserves exprimées plus haut.

Tableau VII (d'après 44)

Nombre de ponts disulfures/mole et activité spécifique de divers lysozymes (13, 44, 64).

Lysozyme	Activité spécifique	Ponts disulfures résidus/mole
Blanc d'oeuf de poule	1	4
Blanc d'oeuf de cane	1	4
Lysozymes humains	3,5 ± 0,5	3
Blanc d'oeuf d'oie	5,5 ± 0,5	2
Nephthys hombergi	4 - 5	2

5. L'activité lytique extrêmement importante mise en évidence dans certaines conditions (microdosage) chez l'Annélide Nerine cirratulus est peut-être due à un colorant modifié ou détruit au cours du traitement à 37° qui serait ainsi la cause de la baisse de la densité optique.

6. De nouvelles recherches devront être consacrées à la première étape de la préparation d'un lysozyme d'invertébré; l'état des animaux (frais ou conservés dans l'acétone), la durée du broyage et la température à laquelle il doit être effectué, devront être précisés grâce à une étude mettant en jeu un grand nombre d'invertébrés.

En-dehors d'une recherche systématique de lysozyme chez les invertébrés, nous avons précisé deux points importants: le liquide de broyage le mieux adapté pour les invertébrés étudiés est sans conteste l'acide acétique 0,1 N; ce liquide peut également être employé pour les filtrations sur Sephadex. De plus, nos essais ont montré qu'il est absolument indispensable de détecter la présence d'un lysozyme par plusieurs procédés

et non par un seul. Les expériences de Malke (63, 65) qui a fait des travaux analogues chez les insectes, nous ont montré cela nettement. Cet auteur n'a employé qu'un dosage microbiologique, et au moins une partie de ses résultats s'est révélée inexacte (66).

II. Contribution à l'étude des lysozymes provenant des leucocytes d'hommes normaux (N.) et de malades atteints de leucémie myéloïde chronique (L.M.C.).

Introduction

La leucémie myéloïde chronique est une prolifération maligne systématisée du tissu myéloïde, c'est-à-dire du tissu ou plutôt de la lignée des globules blancs de la série granuleuse. Sous l'influence d'un traitement, la formule sanguine tend à redevenir normale, mais les rechutes sont inévitables et de moins en moins sensibles au traitement. Les lysozymes des leucocytes N. et L.M.C. utilisés antérieurement au laboratoire (27) avaient été préparés d'une façon différente de celle que nous venons de décrire (Méthodes, II). Les courbes d'élution, après chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50 des leucocytes N. et L.M.C., étaient comparables sinon identiques, le lysozyme des leucocytes L.M.C. montrant seulement un épaulement vers la fin de l'élution. Peut-être les deux courbes étaient-elles parfois légèrement décalées, de sorte que le lysozyme des leucocytes L.M.C. sortait un peu plus tard. Dans les deux cas, le pic principal était précédé d'un pic beaucoup plus petit, qui ne contenait que 5 % de la totalité de l'activité lysante. La gravité de la maladie nous a incités à reprendre cette question et à essayer de déterminer si

nous nous trouvions en présence d'un seul, de deux ou de plusieurs lysozymes dans le cas des leucocytes L.M.C. Pour pouvoir faire des comparaisons valables, nous avons travaillé en même temps avec des leucocytes N. Nos études consacrées aux lysozymes de blanc d'oeuf de cane (voir plus loin) nous avaient permis de constater la disparition d'un pic biologiquement actif au cours de certaines préparations; nous avons donc essayé de nous rendre compte d'abord si le petit pic décelé au cours des chromatographies d'équilibre des lysozymes des leucocytes L.M.C. et N. n'était pas représentatif d'un lysozyme dénaturé par le prétraitement et, ensuite, si l'épaulement de la courbe obtenue avec les leucocytes L.M.C. ne correspondait pas à un véritable pic, ce qui pourrait indiquer une différence entre les lysozymes de leucocytes L.M.C. et N.

Résultats.

1. Broyage et chauffage (voir Tableaux VIII et IX).

Les broyages dans une solution tampon de phosphates (pH 6,98; 0,05 M) ont été faits dans le but de charger la solution, après une concentration (quatre fois) directement sur une colonne d'Amberlite CG-50. Nous les avons abandonnés parce que les leucocytes tendaient à former un gel difficile à travailler. De plus, il n'était pas possible à ce pH de chauffer, car le lysozyme précipitait avec d'autres protéines. Nous avons donc utilisé de l'acide acétique (pH 3,5; 0,1 N) après avoir vérifié au cours de deux essais avec du lysozyme de lait humain (figure 5) qu'une petite quantité d'acide acétique dilué ne retardait pas la sortie du lysozyme sur une colonne d'Amberlite CG-50.

D'autre part, en broyant des quantités relativement importantes de leucocytes, nous avons été surpris de la faible quantité de lysozyme obtenue dans les conditions qui viennent

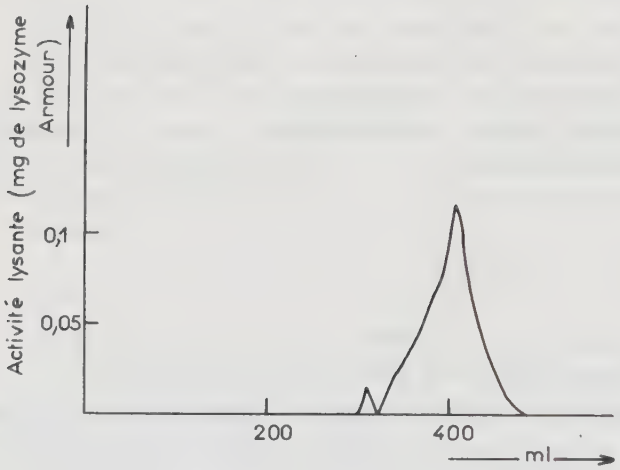


Figure 5

Chromatographie d'équilibre du lysozyme de lait de femme sur Amberlite CG-50 (pH 6,98; 0,2 M; colonne 56 x 1,8 cm; échantillon chargé dans CH_3COOH 0,1 N ou solution tampon).

d'être décrites (Tableau VIII, essais du 2[illegible].2. et du 1[illegible].4.). Nous avons donc essayé de broyer à plusieurs reprises les culots formés au cours d'une première préparation; effectivement, la quantité de lysozyme que l'on peut obtenir dans ces conditions pour un même poids de leucocytes se trouve considérablement accrue (Tableau VIII, essai du 16.6. et suivants). Enfin, après chauffage (voir Tableau IX), le lysozyme restait en général soluble, tandis qu'une grande partie des protéines inactives envers M. lysodeikticus précipitait. En moyenne, la teneur en lysozyme des leucocytes I. .J. et M. était, grâce à ce procédé faisant appel à un "rebroyage" des culots, de 5. [illegible] µg/g de leucocytes secs.

2. Filtrations sur Sephadex G-25.

Les échantillons obtenus après broyage ont été parfois filtrés sur Sephadex G-25 avant de subir une chromatographie d'équilibre: cette filtration nous a permis de constater que le lysozyme biologiquement actif était élué tout de suite après l'hémoglobine. Grâce à un enregistrement automatique à 280 mµ avec un appareil "Uvicord", nous avons pu également nous rendre compte qu'un grand nombre de pics suivaient le pic actif de lysozyme, même si la solution chargée avait subi préalablement un chauffage.

3. Chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50.
(Tableau X et figures 6 à 11)

Nous avons tout d'abord veillé à effectuer, dans la mesure du possible, toutes nos séparations sur la même colonne afin de pouvoir comparer les résultats. Au cours de nos très nombreux essais de chromatographie, nous nous sommes rendus compte que, suivant les conditions expérimentales, notamment les traitements ayant précédé la chromatographie d'équilibre, le nombre de pics actifs envers M. lysodeikticus, leur volume d'élution, enfin les rendements, variaient énormement. Une série

Tableau VIII

Obtention de solutions riches en lysozyme par broyage des leucocytes L.M.C. et N.

Date	Liquide de broyage	Surnageant après centrifugation (ml)	Poids des leucocytes secs (g)	Activité lytique du surnageant	
				µg	µg/g de leucocytes secs
	Leucocytes L.M.C.				
20.2.	tampon (pH 6,98; 0,05 M)	54,1	5	10.600	2.400
	ac.acét. 0,1 N	15,2		1.460	
10.4.	tampon (pH 6,98; 0,05 M)	8,5	2,86	6.800	4.930
	tampon (pH 6,98; 0,05 M)	14,0		7.300	
19.4	tampon (pH 6,98; 0,05 M)	4,9	2,6	13.900	5.350
16.6	ac.acét. 0,1 N	40	0,8	17.000	21.200
17.7.	ac.acét. 0,1 N	34	0,7	5.780	8.260
9.10.	ac.acét. 0,1 N	47	4,88	17.800	3.700
	Leucocytes N.				
18.5.	ac.acét. 0,1 N	8	1,85	5.200	2.800
6.6.	ac.acét. 0,1 N	47	1,08	14.170	13.100
8.6.	ac.acét. 0,1 N	34	2,7	13.600	5.000
20.6.	ac.acét. 0,1 N	36	3,4	14.400	4.240

Tableau IX

Stabilité au cours du chauffage des lysozymes de leucocytes L.M.C. et N.

(Conditions: 1' à 100°)

Date	Milieu	Activité avant chauffage (µg)	Activité après 1' de chauffage (µg)	Rendement (%)
	Leucocytes L.M.C.			
20.2.	tampon (pH 6,98; 0,05 M)	2.440	-	0
16.6.	ac.acét. 0,01 N	17.000	17.500	100
9.10.	ac.acét. 0,01 N	14.800	9.750	66
	Leucocytes N.			
7..	ac.acét. 0,01 N	12.650	11.750	93
..	ac.acét. 0,01 N	24.500	20.100	82

d'expériences a donc été entreprise pour essayer de clarifier cette situation apparemment confuse.

En ce qui concerne le rendement, le tableau X montre qu'il est d'autant plus grand que le produit utilisé pour la chromatographie d'équilibre a subi un plus grand nombre de purifications.

Le nombre de pics obtenus avec le lysozyme de leucocytes L.M.C. est également fonction du prétraitement. Sans purification préalable, trois pics actifs principaux ont été décelés (figure 6). Après purification sur Sephadex G-25 (figure 7), nous avons obtenu une chromatgraphie avec un pic très net et un épaulement précédant la sortie du principal pic actif. Il a été vérifié par des hydrolyses alcalines suivies de dosages avec le réactif à la ninhydrine qu'il ne s'agissait pas d'une partie désactivée du lysozyme. Après chauffage et purification sur Sephadex G-25 (figure 8), nous avons obtenu une chromatographie avec au moins deux pics actifs différents.

Au cours des chromatographies d'équilibre avec le lysozyme provenant des leucocytes N. n'ayant pas subi de prétraitement (figure 9), nous avons caractérisé trois parties principales dont la séparation n'est pas très nette. Après passage sur Sephadex G-25, la séparation est meilleure (figure 10). Le lysozyme est élué dans un volume plus grand que dans le cas précédent. La figure 11 montre la chromatographie d'équilibre après chauffage et filtration sur Sephadex G-25; un pic unique a été repéré; il sort entre la deuxième et la troisième partie de la chromatographie représentée sur la figure 10. L'homogénéité de ce pic a été vérifiée par une électrophorèse sur bande de Cellogel.

Tableau X

Chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50 (pH 6,98; 0,2 M) des lysozymes des leucocytes L.M.C. et N.

Exp.	Pré-traitement	Charge (µg)	Elution (µg)	Rendement (%)	Elution du lysozyme (en ml)					
					Partie I	%	Partie II	%	Partie III	%
Leucocytes L.M.C.										
6	* (1)	6.800	3.000	44	335-365	32	366-390	50	390-410	18
7	* (2)	16.200	10.950	67,5	525-570	11	571-620	89	-	
8	* (3)(4)	7.000	4.740	68	760-895	68	896-960	32	-	
Leucocytes N										
9	* (1)	5.200	2.260	44	337-390	44	405-520	55	525-580	1
10	* (2)	10.000	5.550	55	420-480	26	481-528	38	529-618	36
11	* (3)	15.420	14.650	95	540-560	100	-			

* (1) Solution chargée directement après broyage

* (2) Solution chargée après filtration sur Sephadex G-25 (pH 3,5)

* (3) Solution chargée après chauffage (1'; 100°) et filtration sur Sephadex G-25 (pH 3,5)

* (4) Colonne de mêmes dimensions, qui a été refaite

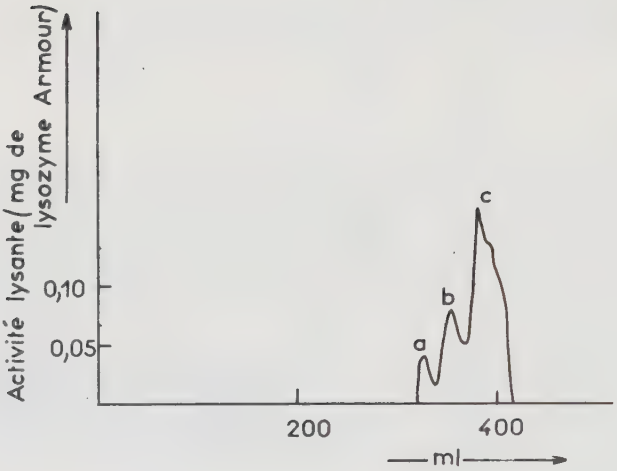


Figure 6

Chromatographie d'équilibre du lysozyme des leucocytes L.M.C. sur Amberlite CG-50 (pH 6,98; 0,2 M; colonne 56 x 1,8 cm); directement après broyage à pH 6,98

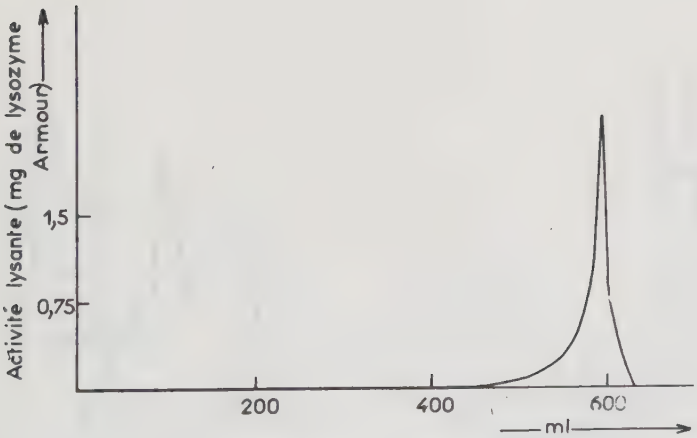


Figure 7

Chromatographie d'équilibre du lysozyme des leucocytes L.M.C. sur Amberlite CG-50 (pH 6,98; 0,2 M; colonne 56 x 1,8 cm) après dessalification sur Sephadex G-25 (pH 3,5).

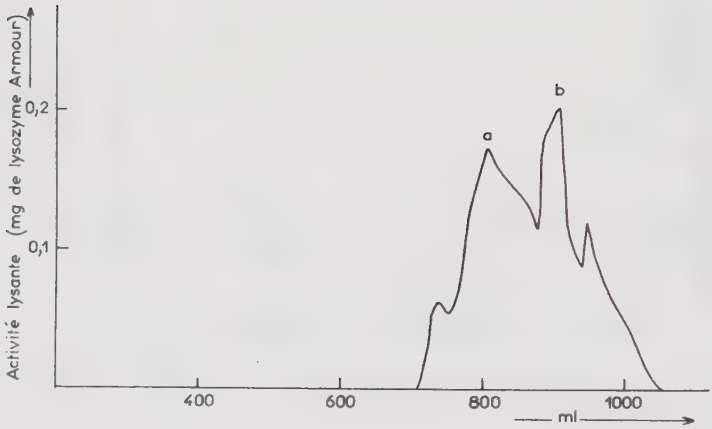


Figure 8

Chromatographie d'équilibre du lysozyme des leucocytes L.M.C. sur Amberlite CG-50 (pH 6,98; 0,2 M; colonne 56 x 1,8 cm) après chauffage (1'; 100°) et dessalification sur Sephadex G-25 (pH 3,5).

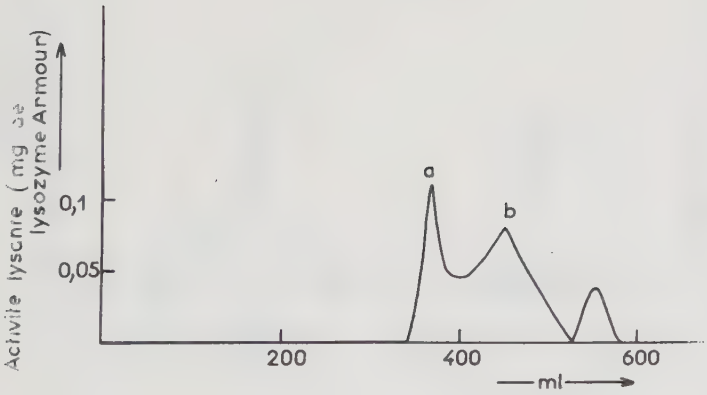


Figure 9

Chromatographie d'équilibre du lysozyme des leucocytes N. sur Amberlite CG-50 (pH 6,98; 0,2 M; colonne 56 x 1,8 cm) après broyage à pH 3,5.

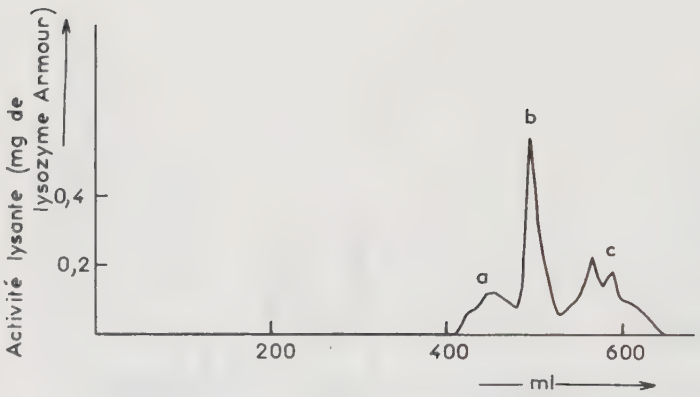


Figure 10

Chromatographie d'équilibre du lysozyme des leucocytes N. sur Amberlite CG-50 (pH 6,98; 0,2 M; colonne 56 x 1,8 cm) après dessalification sur Sephadex G-25 (pH 3,5).

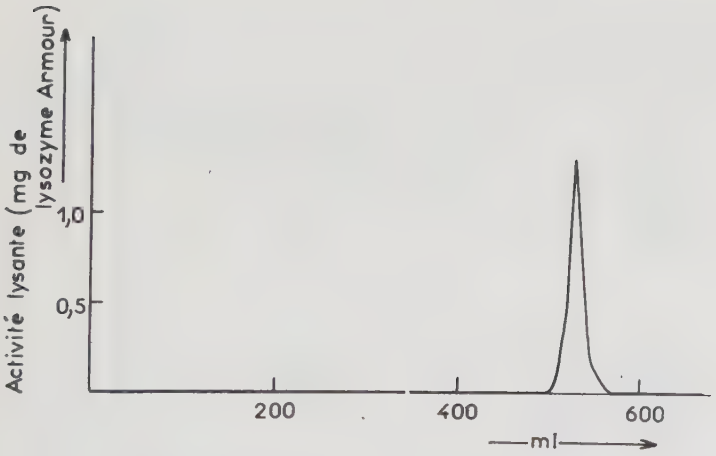


Figure 11

Chromatographie d'équilibre du lysozyme des leucocytes N. sur Amberlite CG-50 (pH 6,98; 0,2 M; colonne 56 x 1,8cm) après chauffage (1'; 100°) et dessalification sur Sephadex G-25.

4. Dessalage des différents pics sur Sephadex G-25.

L'enregistrement automatique à 280 mμ à l'aide d'u "Uvicord" des constituants contenus dans le filtrat provenan d'une colonne de Sephadex G-25 utilisée pour la dessalification des pics caractérisés au cours de la chromatographie d'équilibre, nous a permis de faire une observation curieus La première partie des substances biologiquement actives est éluée nettement plus tôt que la deuxième. Cette observation est valable aussi bien pour le lysozyme isolé des leucocytes L.M.C. que pour celui provenant des leucocytes N. Les analys ne nous ont cependant pas donné jusqu'à présent l'impression d'une différence de poids moléculaire.
(Tableau A bis)

Tableau X bis

Dessalification des différents pics (fig. 6 à 11) sur Sephadex G-25 (colonne 130 x 2,4 cm); comparaison des volumes d'élution

Figure	Partie	Volume d'élution du lysozyme (en ml)
Leucocytes L.M.C.		
6	I	190 - 274
6	II	264 - 340
6	III	250 - 340
7	I	150 - 203
7	II	190 - 280
8	I	171 - 234
8	II	210 - 270
Leucocytes N.		
9	I	224 - 272
9	II	234 - 306
10	I	150 - 204
10	II	174 - 224
10	III	206 - 288
11	I	151 - 240

5. Composition quantitative en acides aminés.
(Tableaux XI et XII).

Les compositions quantitatives en acides aminés des différentes parties biologiquement actives caractérisées au cours des chromatographies d'équilibre sur Amberlite CG-50 des extraits provenant des leucocytes L.M.C. et N. sont indiquées respectivement dans les tableaux XI et XII. Les résultats exprimés en résidus/mole ont été obtenus après un seul temps d'hydrolyse. Il n'est donc pas question ici de donner une composition définitive en acides aminés de ces deux lysozymes. Mais ces analyses permettent de se rendre compte que les différents produits actifs, à une ou deux exceptions près, ont une composition très voisine de celle établie pour d'autres lysozymes humains (13, 24). Seule la partie III provenant des leucocytes N. ne semble pas être un lysozyme (voir aussi discussion).

Cependant, nous trouvons des activités spécifiques très différentes pour les diverses parties biologiquement actives. Leurs valeurs augmentent d'une façon très remarquable: avec le volume d'élution des pics au cours d'une chromatographie d'équilibre, plus le lysozyme est élué tard, plus son activité spécifique augmente. Une exception est constituée par la troisième partie indiquée dans la figure 10, dont l'activité spécifique calculée est plus petite que celle de la deuxième partie. Un mélange des trois parties biologiquement actives des leucocytes N. donne un rapport de 10. (L'activité spécifique du lysozyme de poule est considérée comme étant égale à 1).

Tableau XI

Composition quantitative en acides aminés (résidus/mole) des différentes parties biologiquement actives obtenues à partir de leucocytes L.M.C. après chromatographie d'équilibre (figures 6 à 8) et dessalification.

	Lysozyme de leucocytes L.M.C. suivant (27)	Lysozyme humain suivant (24)	Fig. 6		Fig. 7		Fig. 8	
			partie I	partie II	partie I	partie II	partie I	partie II
Cys SO_3H				0,99		2,1		
Met O_2						0,8		
Asp	18±1	18±1	17,6	11,3	17	21,4	18,3	18,2
Thr	7	6±1	6,5	5,9	5,4	4,6	5,4	5,15
Ser	7±1	6±1	8,5	7,8	6,8	6,3	6,2	8,5
Glu	9±1	9±1	10,7	9,3	9,8	8,1	8,9	12,2
Pro	2-3	2-3	2,3	3,6	1,7	2,8	+	+
Gly	12-13	12±1	13,3	14,4	12,9	10,5	10,0	13,8
Ala	12-13	12±1	14,3	12,6	14,9	14,6	14,7	14,9
Val	7	7	7,0	7,0	8,0	7,8	8,45	8,4
Cys	6	6	3		4,8		+	+
Met	1-2	2	1,7	0,9	0,8		+	+
Ileu	4	5	4,3	5,3	4,2	4,1	5,2	5,9
Leu	8	8	7,1	8,0	7,5	7,5	7,5	7,5
Tyr	4-5	5	3,7	2,9	5,2	4,6	4,3	3,5
Phe	2	2	2,0	2,6	1,4	1,6	1,88	2,48
Lys	4-5	5	5,0	14,4	4,9	4,5	5,4	6,55
His	1	1	1,2	2,0	1,2	1,0	2,6	+
Arg	11	11-12	9,1	9,8	10,6	11,9	13,2	13
activité spécif.			4,2	5,75	4,96	11,5	5,5	14,1

Tableau XII

Composition quantitative en acides aminés (résidus/mole) des différentes parties biologiquement actives obtenues à partir des leucocytes N. après chromatographie d'équilibre (figures 9 à 11) et dessalification

	Lysozyme de leucocytes N. suivant (27)	Lysozyme humain suivant (24)	Fig. 9		Fig. 10				Fig. 11
			partie I	partie II	Partie I	partie II	partie III	partie I-III	partie I
Cys SO_3H					3,7				
Met O_2				1,1					
Asp	18±1	18±1	12,3	13,8	14,8	20,4	11,8	14,4	16
Thr	7-8	6±1	5,3	5,6	5,3	4,7	3,8	3,2	4,1
Ser	7±1	6±1	6,5	8,1	7,7	11,4	5,3	6,8	4,2
Glu	9±1	9±1	10,0	9,4	9,9	5,7	9,1	7,9	7,4
Pro	2-3	2-3	2,2	2,5	4,2		3,4	4,4	
Gly	12-13	12±1	13,6	11,4	12,8	14,3	15,1	10,5	10,6
Ala	12-13	12±1	11,3	11,8	13,8	20,4	13,2	13,5	11,5
Val	7	7	6,8	6,3	6,6	7,5	1,7	8,1	7,3
Cys	6	6	2,3	3,9		5,6	12,4	2,5	5,3
Met	1-2	2	1,8		0,7	1,3		0,6	1,5
Ileu	4	5	3,8	4,4	5,3	5,3	4,7	5,2	4,3
Leu	8	8	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,3
Tyr	4-5	5	2,6	4,2	4,1	4,9	3,1	4,7	5,2
Phe	2	2	2,5	2,0	1,8	1	1,8	1,8	1,7
Lys	4-5	5	6,0	5,4	6,0	7,6	5,7	4,6	4,4
His	1	1	+	1,2	1,4	1,4	1,8	1,0	1,0
Arg	11	11-12	9,6	9,6	9,1	14,6	9,1	9,3	12,2
Activité spécif.			5,25	6,96	5,07	12,1	4,93	10,0	3,5

5. Filtration sur Sephadex G-75 des lysozymes des leucocytes L.M.C. et des larmes.

Nous avons fait appel à des filtrations sur Sephadex G-75 afin de vérifier si les différences entre les activités spécifiques étaient dues à des différences de poids moléculaire. Notre choix s'est porté sur les leucocytes L.M.C. broyés dans l'éluant et directement chargés sur la colonne. Mais à ce stade de préparation, le lysozyme des leucocytes était accompagné de beaucoup d'autres protéines et une filtration sur Sephadex G-75 ne nous a pas paru assez significative. Comme les larmes humaines n'ont pas besoin d'un prétraitement et ne sont accompagnées que de faibles quantités d'autres protéines, elles constituent un matériel de choix. Au cours d'essais préliminaires, nous avons standardisé notre colonne (114 x 1,2 cm) avec successivement du lysozyme de blanc d'oeuf de poule, du bleu de dextrane (poids moléculaire 2.000.000) et du rouge de méthyle (poids moléculaire 269). Les éluants ont été choisis de façon à travailler d'une part à un pH acide (pH 3,5; acide acétique 0,1 N), d'autre part, à un pH qui se rapproche le plus possible des liquides humains, tels que le sang et les larmes (pH 7,35 à 7,45) (pH 7,2: bicarbonate d'ammonium 0,05 M; pH 7,45: solution de Ringer; c'est une solution isotonique à base de chlorure de sodium).

A pH 3,5 les trois lysozymes (lysozyme de blanc d'oeuf de poule, lysozyme des larmes humaines et lysozyme des leucocytes L.M.C.) étaient élués entre 77 et 86 ml (fig. 11 a). Des essais répétés avec le bleu de dextrane et le rouge de méthyle montrent qu'un petit décalage du volume d'élution est normal. Nous avons obtenu à pH 7,2 (fig. 11 b) un résultat identique: élution du lysozyme de blanc d'oeuf de poule et du lysozyme des leucocytes L.M.C. entre 70 et 85 ml. Malheureusement, le lysozyme de larmes se désactivait dans l'éluant (bicarbonate d'ammonium), de sorte que nous n'avons pu vérifier son volume de sortie à ce pH. Après avoir choisi un éluant plus favorable pour conserver

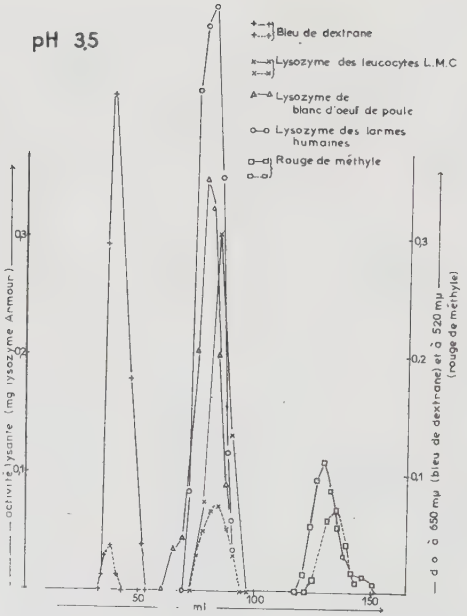


figure 11 a

Filtration de différents lysozymes sur Sephadex G-75 à pH 3,5 (acide acétique 0,1 N) (colonne 114 x 1,2 cm).

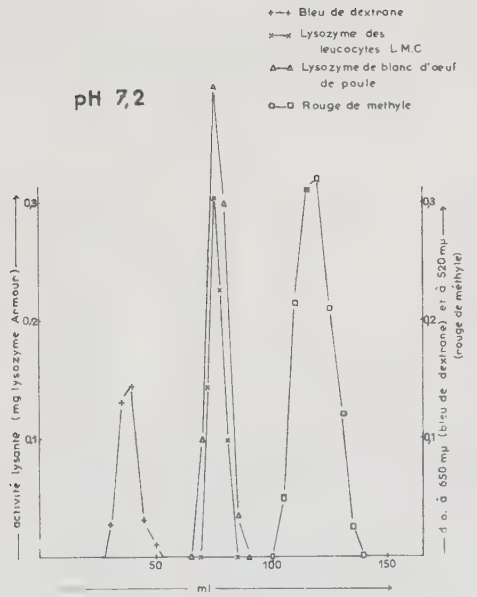


Figure 11 b

Filtration de différents lysozymes sur Sephadex G-75 à pH 7,2 (bicarbonate d'ammonium) (colonne 114 x 1,2 cm).

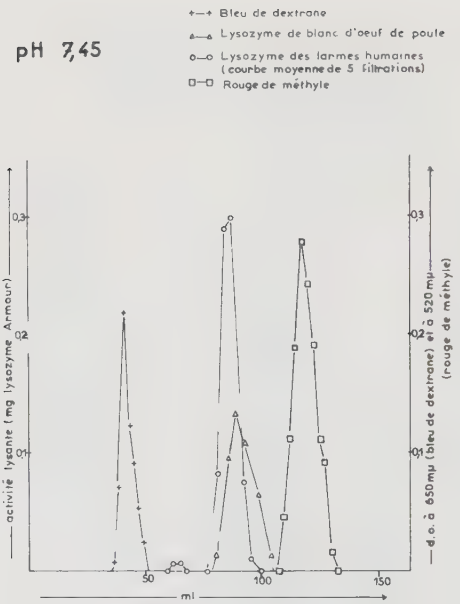


Figure 11 c

Filtration de différents lysozymes sur Sephadex G-75 à pH 7,45 (solution de Ringer) (colonne 114 x 1,2 cm).

ctivité biologique (solution isotonique), nous obtenons [illegible] ution tardive (80 à 100 ml) des lysozymes des larmes humaines des leucocytes L.M.C. (voir fig. 11 c). Le pic principal du ysozyme des larmes (la courbe montrée sur la figure 11 c est e courbe moyenne de cinq essais) était précédé trois fois sur nq d'un petit pic (volume d'élution entre 55 et 70 ml) bio- giquement actif qui correspondait à un pic important sur un parei1 uvicord à 280 mμ.

Conclusions.

1. La teneur en lysozyme des leucocytes, telle que nous avons déterminée n'est pas aussi grande que celle décrite dans la littérature (27). Nous avons voulu travailler avec des solutions les plus concentrées possible, en sorte que nous avons soigneusement négligé d'extraire la totalité du lysozyme. En effet, nous avions déjà démontré dans le tableau VIII que l'extraction de l'enzyme est fonction de la quantité du liquide de broyage. Pour les leucocytes N, nous avons même pu établir une courbe (fig. 12) qui démontre clairement ce phénomène.

2. Dans le cas du lysozyme des leucocytes N, les chromatographies d'équilibre ont montré qu'il existe au moins deux parties différentes, actives envers M. lysodeikticus, dont une semble être éliminée au cours du chauffage. Le volume d'élution était toujours entre 400 et 600 ml (colonne de 36 x 1,8 cm). En ce qui concerne la troisième partie active envers M. lysodeikticus, il s'agit probablement d'un complexe du lysozyme avec une autre protéine.

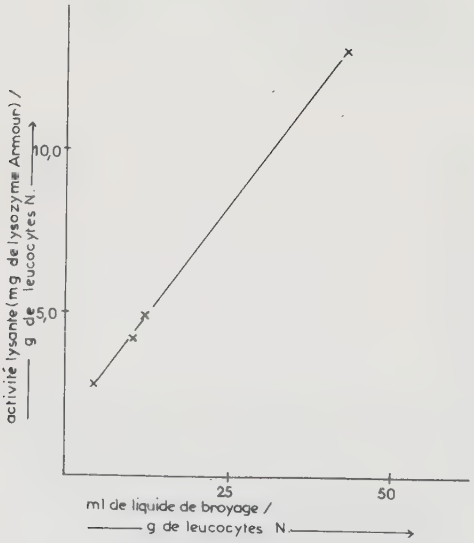


Figure 12

Extraction du lysozyme des leucocytes N. en fonction de la quantité du liquide de broyage (acide acétique 0,1 N).

3. Dans le cas du lysozyme provenant des leucocytes L.M.C., nous avons constaté, même après chauffage, la présence d'au moins deux parties différentes, actives envers M. lysodeikticus, dont le volume d'élution sur Amberlite CG-50 n'est pas constant, mais varie entre 300 et 1000 ml pour une colonne de 56 x 1,8 cm.

4. L'élution retardée de la deuxième partie du lysozyme des leucocytes L.M.C. et N. sur Sephadex G-25 pourrait indiquer qu'elle a un poids moléculaire plus faible que la première ou une configuration spatiale différente. Mais il faut noter ici que ce support exclut des protéines d'un poids moléculaire supérieur à 5.000. D'après plusieurs auteurs (67), le lysozyme réagit avec le dextrane comme un faible échangeur d'ions. Une rétention de cet enzyme n'est donc pas nécessairement le signe d'un poids moléculaire plus petit.

5. Les activités spécifiques mises à part, nous n'avons pas pu constater de différences entre les première et deuxième parties biologiquement actives des lysozymes des leucocytes L.M.C. et N. Sophianopoulos (68) rapporte que le lysozyme de poule dimérise réversiblement entre pH 5,4 et pH 9,0. Bruzzeri (69) complète ces recherches en montrant que cet équilibre monomère-dimère renferme des polymères si la concentration du lysozyme est assez grande. Or, nous avons travaillé à pH 6,98 avec une concentration en protéine dix fois moins grande que les chercheurs cités plus haut. Notre hypothèse de travail pour les travaux de filtration sur Sephadex G-75 était basée sur la présence éventuelle d'un mélange de mono- et dimères, la proportion de chaque constituant étant variable suivant le pH. Notre hypothèse n'a pas pu être vérifiée par les moyens choisis, car les filtrations sur Sephadex G-75 ne nous ont pas donné de résultats significatifs. Le petit pic élué avant le pic principal du lysozyme des larmes (fig. 11 c) peut être aussi bien une protéine inactive envers M. lysodeikticus ayant absorbé un peu de lysozyme qu'une petite quantité de lysozyme dimérisé.

III. Contribution à l'étude de la structure des lysozymes de blanc d'oeuf de cane.

Introduction.

Nombre de lysozymes présents dans le blanc d'oeuf de cane.

Le lysozyme de blanc d'oeuf de cane a été préparé suivant la méthode de Jollès (51). Dans un premier stade, en travaillant avec des oeufs de mélange, trois pics biologiquement actifs ont pu être caractérisés au cours de la chromatographie d'équilibre effectuée à pH 7,56, avec une solution tampon de phosphates 0,2 M (lysozymes de cane I, II et III, suivant l'ordre d'élution au cours de la chromatographie). Les deux premiers pics avaient pu être élués avec la solution 0,2 M; par contre, l'élution du troisième pic a nécessité l'emploi d'une solution 0,8 M (figure 13) (29). La composition quantitative en acides aminés de ces trois pics I, II et III avait été établie par Jollès et coll. (29) (voir Tableau XIII): les deux substances II et III ne contenaient pas d'histidine.

Au cours de nos recherches qui avaient pour but de préparer de grandes quantités des lysozymes II et III chromatographiquement purs en vue d'études de structure, nous nous sommes aperçus que l'enzyme III pouvait être élué avec la solution tampon 0,2 M en poursuivant pendant un temps suffisamment long l'élution de la colonne; la figure 14 rend compte d'une expérience de ce genre; au cours de cet essai, nous n'avions pas mis en évidence le pic I. Actuellement, des recherches concernant le nombre de lysozymes présents dans le blanc d'oeuf provenant de différentes espèces de cane sont en cours au laboratoire. A titre d'exemple, nous montrons dans la figure 15 une chromatographie d'équilibre effectuée avec le lysozyme contenu dans le blanc d'oeuf de cane, race Pékin. Un seul pic biologiquement

Tableau XIII

Composition quantitative en acides aminés des lysozymes de blanc d'oeuf de poule (5) et de cane (29)

	Cane I D_I (= D I)	Cane II D_{II} (= D II)	Cane III D_{III} (= D III)	Poule
Asp	20-21	19	18-19	21
Thr	7-8	7	7	7
Ser	10	10	10-11	10
Glu	5-6	5	5	5
Pro	2-3	2	22	2
Gly	12-13	12	12	12
Ala	11-12	11	11	12
Val	6	7	7	6
Cys	8	8	8	8
Met	2	2	2	2
Ileu	6	6	6	6
Leu	8	8	8	8
Tyr	3	5	5	3
Phe	3	1	1	3
Trp	6	6	6	6
Lys	6	6	6	6
His	1	0	0	1
Arg	11	12-13	13-14	11
Total	127-133	127-128	127-130	129

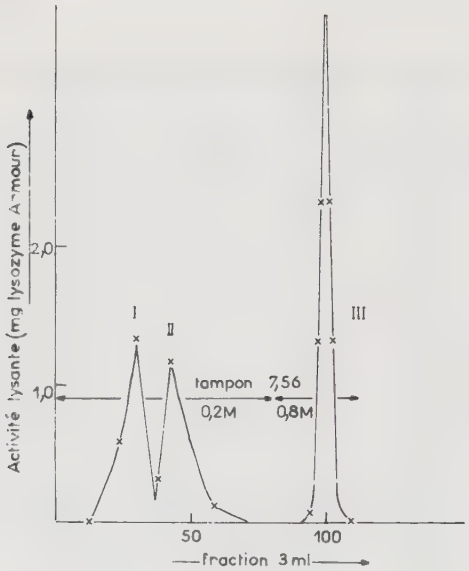


Figure 13

Chromatographie d'équilibre du lysozyme de blanc d'oeuf de cane sur Amberlite CG-50 (56 x 1,7 cm) suivant réf.(29); charge : 55.000 µg; rendement total 64%.

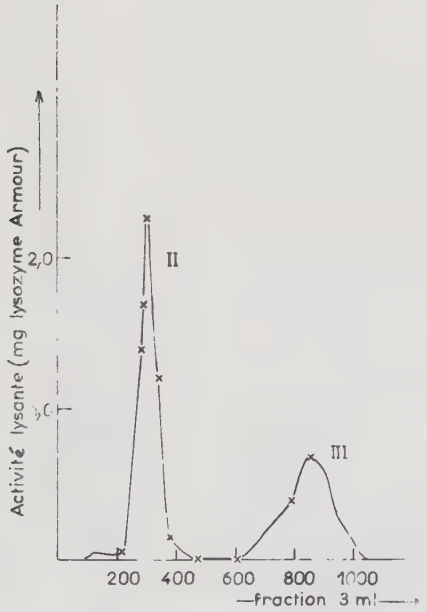


Figure 14

Chromatographie d'équilibre du lysozyme de blanc d'oeuf de cane sur Amberlite CG-50 (90 x 2,7 cm; pH 7,56; 0,2 M); charge : 300 mg; rendement total: 72%.

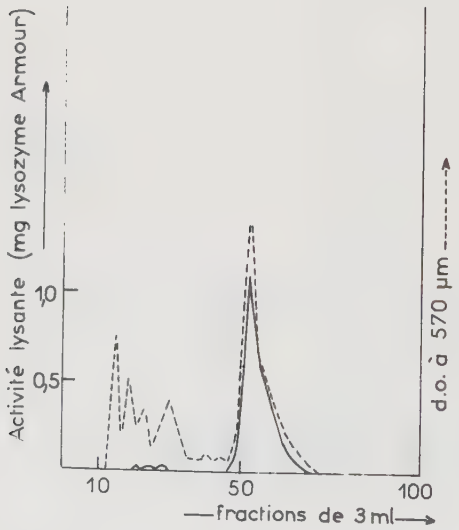


Figure 15

Chromatographie d'équilibre du lysozyme de blanc d'oeuf de cane, race Pékin, sur Amberlite CG-50 (64 x 1,5 cm; pH 7,56; 0,2 M); charge 28.000 µg; rendement 68%.

actif, représentant 68% de l'activité mise en jeu au départ, a pu être caractérisé. Il ne contient pas d'histidine.

Nos études de structure ont été effectuées avec deux lysozymes isolés à partir de blancs d'oeufs de mélange et appelés, après chromatographie d'équilibre (figure 14), lysozymes D II et D III (Tableau XIII). L'établissement de la structure complète de ces lysozymes est en cours au laboratoire. La première étape consiste à digérer ces enzymes par la trypsine (EC 3.4.4.4.) qui scinde de facon spécifique les chaînes peptidiques au niveau des seuls résidus de lysine et d'arginine. Mais pour réunir tous ces peptides trypsiques dans l'ordre qui est le leur au sein de la molécule primitive, il était nécessaire de scinder les lysozymes par un autre enzyme possédant une spécificité différente. C'est vers la chymotrypsine (EC 3.4.4.5.) qui coupe les chaînes peptidiques au niveau des résidus d'acides aminés aromatiques, de leucine, de méthionine et d'asparagine que s'est porté notre choix:les peptides obtenus par hydrolyse chymotrypsique et contenant des résidus d'acides aminés basiques constituent ainsi des ponts entre une ou plusieurs "unités trypsiques". Dans cette troisième partie nous allons rendre compte des résultats actuellement acquis dans l'étude de ces unités "chymotrypsiques".

Séparation des constituants de l'hydrolysat chymotrypsique.

Les lysozymes de cane D II et D III (figure 14 et tableau XIII) ont été réduits puis soumis à l'action de la chymotrypsine, comme indiqué dans la partie consacrée aux Méthodes. Les hydrolysats chymotrypsiques ont ensuite été chromatographiés sur des colonnes de Dowex 1 X 2. A partir de lysozyme D II, 24 pics, appelés D II/1 à D II/24, ont été décelés (figure 16); dans le cas du lysozyme D III, 20 pics, appelés D III/1 à D III/20, ont été caractérisés (figure 17). Comme les gradients utilisés au cours des deux chromatographies n'étaient pas les mêmes, on ne peut donc pas comparer directement les courbes d'élution.

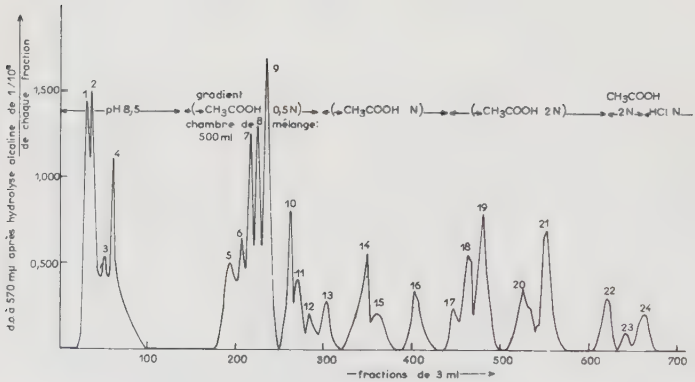


Figure 16

Lysozyme de cane II (12 μM): séparation des pics D II/1 à D II/24 sur colonne de Dowex 1X2 (140 x 1,5 cm).

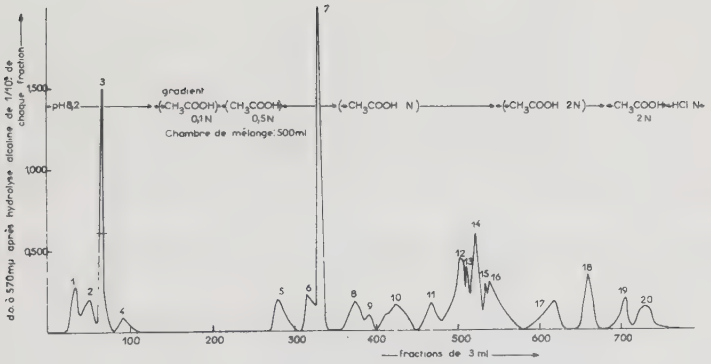


Figure 17

Lysozyme de cane D III (4,4 μM): séparation des pics D III/1 à D III/20 sur colonne de Dowex 1X2 (140 x 1,5 cm).

Actuellement, tous les peptides contenus dans ces différents pic n'ont pas encore pu être étudiés en détail. Mais grâce aux résultats déjà obtenus, nous avons pu effectuer de nombreuses comparaisons entre les deux lysozymes de cane et entre ces enzymes et le lysozyme de blanc d'oeuf de poule.

Caractérisation des peptides contenus dans les différents pics isolés par chromatographie.

Les tableaux XIV et XV indiquent les R_f dans le solvan n-butanol:acide formique:eau et les mobilités déterminées à pH 6,5 (voir Partie Méthodes) des peptides contenus dans les différents pics provenant des hydrolysats chymotrypsiques des lysozymes de cane D II et D III. Pour faciliter les comparaisons avec les "unités chymotrypsiques" du lysozyme de poule (C 1 à C 26), nous avons rappelé dans le Tableau XVI leurs R_f et m qui avaient été déterminés précédemment dans les mêmes conditions (6

Analyse des unités chymotrypsiques des lysozymes de cane D II et D III.

Les tableaux XVII et XVIII indiquent les compositions quantitatives en acides aminés des différentes "unités chymotrypsiques" étudiées jusqu'à ce jour: dans le cas du lysozyme de cane D II, 16 peptides comprenant 92 acides aminés sur un total de 127-128 ont été analysés; dans le cas du lysozyme D III, les 14 peptides étudiés renfermaient 77 acides aminés sur un total de 127-130. Indiquons ici que le nombre minimum d'unités chymotrypsiques que l'on doit obtenir à partir des lysozymes de cane est de 20 (12 résidus d'acides aminés aromatiques et 8 résidus de leucine; les deux résidus de méthionine n'interviennent pas, car après réduction, la chymotrypsine ne scinde plus les liaison impliquant les produits qui résultent de la transformation de cet acide aminé).

Tableau XIV

R_f et m des unités chymotrypsiques D II

D II	R_f	m
1	0	+ 0,65
2	0	+ 0,22
4	0,10	+ 0,36
5 a	0,12	+ 0,45
5 b	0,16	+ 0,30
5 c	0,27	n.d.
9 a	0,01	0
9 b	0,78	0
14	0,12	- 0,32
16	0,55	0
17	0,40	0
18	0,22	- 0,35
19	0	- 0,25
21	0,27	- 0,40
22 a	0,16	- 0,30
22 b	0,45	n.d.

R_f dans le solvant n-butanol:acide acétique:eau (75:15:10;v/v)

m (à pH 6,5) par rapport à celles de l'arginine, m = +1 et de $CysSO_3H$, m = -1; m = 0 pour le glycocolle.

Tableau XV

R_f et m des unités chymotrypsiques D III

D III	R_f	m
1	0	+ 0,65
2	0	+ 0,28
4	0,10	+ 0,36
5	0,16	+ 0,30
6	0,12	+ 0,45
7 a	0,01	0
7 b	0,78	0
12 a	0,10	- 0,30
12 b	0,55	0
13	0,22	- 0,35
14	0	- 0,25
16	0,40	0
17	0,27	- 0,40
18	0,16	- 0,30

R_f et m, voir Tabl. XIV

Tableau XVI

R_f et m des unités chymotrypsiques du lysozyme de blanc d'oeuf de poule, mentionnées dans le texte d'après (6).

C	R_f	m
1	0	+ 0,7
6	0,18	+ 0,45
7	0,35	+ 0,35
9	0,16	+ 0,50
10	0,27	+ 0,40
11	0	0
12 b	0,78	0
13 a	0,27	0
14	0,01	0
17 b	0,12	- 0,25
19	0,55	0
20	0,16	- 0,46
21	0	- 0,23
22	0,40	0
25 + 26	0,35	- 0,60

R_f et m, voir Tableau XIV.

Tableau XVII

Composition quantitative en acides aminés et rendement (après une purification) des unités chymotrypsiques du lysozyme de blanc d'oeuf de cane D II

Ac. aminé	Unité chymotrypsique D II																Total	Nombre théorique (29)
	1	2	4	5a	5b	5c	9a	9b	14	16	17	18	19	21	22a	22b		
Asp		2				1	2				1		3	2	1		12	19
Thr		1					2						2				5	7
Ser		1				1			1		1	2	1			1	8	10
Glu						1	1		1			1					4	5
Pro																1	1	2
Gly		1	1	1				1			1		1	1		1	8	12
Ala	3						1			1					2	1	8	11
Val		1			1					1					1	1	5	7
Cys		1	1						1						1	2	6	8
Met	1																1	2
Ileu			1			1		1								1	4	6
Leu	1		1					1	1		1			1		1	7	8
Tyr				1	1								1	1	1		5	5
Phe												1					1	1
Trp		1				1				1	1						4	6
Lys	1	1			1												3	6
Arg	1	3	2	1		1			1				1				10	12-13
Total	7	12	6	3	3	6	6	3	5	3	5	4	9	5	6	9	92	127-12
Rendement %	28	10	40	16	10	3	60	11	42	30	40	77	67	70	10	9		

Tableau XVIII

Composition quantitative en acides aminés et rendement (après une purification) des unités chymotrypsiques du lysozyme de blanc d'oeuf de cane D III

Ac. aminé	Unité chymotrypsique D III														Total	Nombre théorique (29)
	1	2	4	5	6	7a	7b	12a	12b	13	14	15	17	18		
Asp		2				2					3	1	2	1	11	18-19
Thr		1				2					2				5	7
Ser		1								1	1	1			4	10-11
Glu						1		2		1					4	5
Pro															-	2
Gly		1	1		1		1			1	1	1	1		8	12
Ala	3					1			1					2	7	11
Val		1		1					1					1	4	7
Cys		1	1					1						1	4	8
Met	1														1	2
Ileu			1				1								2	6
Leu	1		1				1	1				1	1		6	8
Tyr				1	1						1		1	1	5	5
Phe										1					1	1
Trp		1							1			1			3	6
Lys	1	1		1											3	6
Arg	1	3	2		1			1			1				9	13-14
Total	7	12	6	3	3	6	3	5	3	4	9	5	5	6	77	127-130
Rendement %	10	17	20	12	35	13	10	16	37	20	12	40	36	25		

Rendement d'obtention des "unités chymotrypsiques".

Les rendements des différents peptides obtenus par hydrolyse chymotrypsique et ayant subi une étape de purification (par chromatographie descendante sur papier ou par ionophorèse sur papier, Méthode,III, procédés D 2 et 3) sont indiqués dans les tableaux XVII et XVIII.

Etablissement de la structure chimique de quelques "unités chymotrypsiques" des lysozymes D II et D III. Comparaison avec les séquences rencontrées dans le lysozyme de poule.

Les résultats analytiques nous ont montré que les différences entre les "unités chymotrypsiques" des lysozymes de cane d'une part et de poule d'autre part sont nombreuses : toutefois, les peptides conservent dans leur ensemble une grande analogie. Aussi, aux peptides des lysozymes de cane qui ont une composition et des comportements chromatographiques et électrophorétiques identiques à ceux des séquences étudiées en détail (6) dans le cas du lysozyme de poule, nous avons attribué la même structure. Nos propres études de structure ont donc essentiellement porté sur les enchaînements qui diffèrent entre les lysozymes de cane et de poule; une attitude analogue avait été adoptée par les chercheurs impliqués dans l'étude comparée d'autres protéines, notamment des hémoglobines (70).

D II/1 - D III/1

Le tableau XIX indique les acides aminés et séquences obtenus par divers procédés de scission (aminopeptidase, trypsine, carboxypeptidase) et ayant servi à l'établissement de la structure des peptides D II/1 et D III/1 qui sont identiques.

Tableau XIX

Etablissement de la structure des peptides D II/1 et D III/1
Comparaison avec la séquence analogue rencontrée dans le lysozyme de poule

Compositions identiques : Ala_3, HS, Leu, Lys, Arg

Méthode	Substances isolées
Aminopeptidase	Ala- Ala
Trypsine	(Ala, Ala, Ala, HS*, Lys) (Ala, Ala, Ala, HS*, Lys, Arg) (Arg, Leu) Leu
Carboxypeptidase	Leu
Structure (cane)	Ala - Ala-(Ala, HS*)-Lys - Arg - Leu
Structure (poule)	Ala - Ala - Ala - HS* - Lys - Arg - His

* HS, homosérine provenant après réduction de la méthionine.

Le peptide correspondant du lysozyme de poule s'y trouve également indiqué (C 1, réf. 6); sa structure est la même à un résidu près, ce qui permet dans le tableau XXIII de développer complètement la structure du peptide provenant de la cane. Notons que nous sommes ici en présence d'un enchaînement important pour l'étude des relations entre structure et activité. En effet, le résidu 15 du lysozyme de poule, à savoir l'unique résidu d'histidine de cette molécule, est remplacé dans les deux lysozymes de cane dépourvus d'histidine par un résidu de leucine. Le résidu d'histidine n'est donc nullement impliqué dans un "centre actif".

D II/2 et D III/2

Les peptides D II/2 et D III/2 ont la même composition et les mêmes R_f et m. Le tableau XX résume les expériences qui ont permis d'attribuer aux peptides D II/2 et D III/2 une formule partiellement développée. Un peptide de structure très voisine avait été étudié en détail dans le cas du lysozyme de poule (peptide C 11, réf. 6); mais deux changements sont à signaler ici: les résidus N°116 (Lys), N° 121 (Gln) et N° 122 (Ala) du lysozyme de poule ont été remplacés respectivement par des résidus d'arginine, de sérine et de lysine. Il faut souligner plus particulièrement l'apparition d'un nouveau résidu d'acide aminé basique dans les lysozymes de cane.

D II/4 et D III/4

Les deux peptides ont la même composition et les mêmes R_f et m. Le tableau XXI résume les expériences que nous avons effectuées pour établir leur structure. Un peptide identique avait été trouvé dans le lysozyme de poule (peptide C 6, réf. 6): il représentait l'enchaînement C-terminal de l'enzyme. Il apparaît donc que les trois lysozymes que nous étudions ici ont la même séquence C-terminale.

Tableau XX

Etablissement de la structure des peptides D II/2 et D III/2

Comparaison avec le lysozyme de poule

Méthode	Substances isolées	
Amino-peptidase	Arg	
Hydrolyse trypsique	SCMCys-Arg	Trp
	(Asp,Arg, SCMCys,Arg, Gly,Thr,Asp,Val,Ser)-Lys-Trp	
	Arg-((SCMCys-Arg),Gly,Thr,Asp,Val,Ser)-Lys-Trp	
Carboxy-paptidase		Trp
Structure (cane)	Arg-Asn-Arg- SCMCys-Arg-(Gly,Thr,Asp,Val Ser)-Lys-Trp	
Structure (poule)	Arg-Asn-Arg- SCMCys-Lys- Gly-Thr-Asp-Val-Gln - Ala-Trp	

Tableau XXI

Etablissement de la structure des peptides D II/4 et D III/4

Comparaison avec le lysozyme de poule

Méthode	Substances isolées
Aminopeptidase	Ileu
Aminopeptidase	Ileu-Arg
Hydrolyse trypsique	(Gly,SCMCys, Arg,Leu) (Gly,SCMCys, Arg) Leu
Carboxypeptidase	Leu
Structure (cane)	Ileu-Arg-(Gly,SCMCys)-Arg-Leu
Structure (poule)	Ileu-Arg - Gly-SCMCys - Arg-Leu

D II/5_b_et D III/5

Il s'agit ici de deux peptides ayant la même composition et les mêmes R_f et m. Les acides N- et C-terminaux sont respectivement Lys et Tyr; la structure se trouve donc établie: Lys-Val-Tyr. Dans le cas du lysozyme de poule, un peptide voisin Lys-Val-Phe, séquence N-terminale de l'enzyme, avait été décrit (peptide C 7, réf. 6). Les séquences N-terminales des lysozymes de cane et de poule sont donc légèrement différentes: Lys-Val-Tyr dans le premier cas, Lys-Val-Phe dans le second.

D II/5_a_et D III/6

Les deux peptides ont la même composition et les mêmes R_f et m. Les acides aminés N- et C-terminaux sont respectivement Arg et Tyr. La structure se trouve donc établie : Arg-Gly-Tyr. Le même peptide avait été caractérisé dans le lysozyme de poule (enchaînement 21 à 23, peptide C 9, réf. 6).

D II/5_c

Il s'agit du peptide : (Asx,Ser,Glx,Ileu,Trp,Arg). Parmi les "unités chymotrypsiques" du lysozyme de poule, un peptide ayant la même composition et le même R_f avait été caractérisé (C 10, réf. 6). En tenant compte de ce qui a été indiqué dans l'introduction, on peut, dans un premier temps, attribuer à ce peptide de cane la même structure que celle qui a été établie en détail pour le peptide du lysozyme de poule : Gln-Asn-Ileu-Ser-Arg-Trp.

D II/9_a_et D III/7a

Les deux peptides ont la même composition et les mêmes R_f et m. L'acide aminé N-terminal comme l'acide aminé C-terminal est Asn. La mobilité du peptide à pH 6,5 est nulle : il est donc normal que les différents résidus Asp et Glu

soient amidés. La structure partielle du peptide est donc : Asn-(Thr,Thr,Gln,Ala)-Asn. Un peptide de même composition et possédant les mêmes caractéristiques (R_f et m) avait été trouvé dans l'enzyme de la poule (peptide C 14, réf. 6). La structure avait été établie comme étant: Asn-Gln-Ala-Thr-Thr-Asn.

D II/7

Les acides aminés N- et C-terminaux sont respectivement Arg et Trp. Il s'agit ici d'un peptide de l'enchaînement déjà décrit en D II/2, mais raccourci de deux acides aminés (Asp et Arg); le tableau XX permet de se rendre compte de la structure probable qui peut être attribuée à cet enchaînement.

D II/9_b_et D III/7 b

Les deux peptides ont la même composition en acides aminés et les mêmes R_f et m. Les acides aminés N- et C-terminaux sont respectivement Gly et Leu. La structure est donc: Gly-Ileu-Leu. Ce même enchaînement existe dans le lysozyme de blanc d'oeuf de poule (séquences 54 à 56, peptide C 12b, réf. 6).

D II/14 et D III/12 a

Le tableau XXII résume les expériences ayant trait à l'étude de la structure de ces deux peptides provenant des lysozymes de cane II et III: leurs compositions diffèrent par un résidu: l'un des peptides possède un résidu de Ser et l'autre un résidu de Gln comme extrémité N-terminale. Pour la première fois, nous avons clairement caractérisé ici une différence de structure entre les deux lysozymes de cane. Les deux peptides ont, à pH 6,5, une mobilité d'environ -0,30; à côté du résidu d'arginine doivent donc figurer deux acides aminés acides; le résidu d'acide glutamique voisin de la SCM-cystéine ne peut donc pas être amidé. La séquence du lysozyme de poule correspondant à ces deux peptides de cane est l'enchaînement Gly-Arg-SCMCys-Glu-Leu (résidus 4 à 8; peptide C 17b, réf.6); le glycocolle

Tableau XXII

Etablissement de la structure des peptides D II/14 et D III/12a
Comparaison avec le lysozyme de poule

a. D II/14

Méthode	Substances isolées
Aminopeptidase	Ser
Hydrolyse trypsique	(Ser,Arg)
	(SMCys, Glu, Leu)
Carboxypeptidase	Leu
Structure (cane II)	Ser-Arg-(SMCys, Glu)-Leu

b. D III/12a

Aminopeptidase	Gln
Hydrolyse trypsique	(Gln,Arg)
	(SCMCys, Glu, Leu)
Carboxypeptidase	Leu
Structure (cane III)	Gln-Arg-(SCMCys, Glu)-Leu
Structure (poule)	Gly-Arg - SCMCys - Glu - Leu

a donc été remplacé soit par un résidu de sérine soit par un résidu de glutamine.

D II/16 et D III/12 b

Les compositions et les R_f et m de ces deux peptides sont les mêmes. Les acides aminés N- et C-terminaux sont respectivement Val et Trp; il s'agit donc d'un peptide de structure : Val-Ala-Trp. La même séquence existe dans le lysozyme de poule (peptide C 19, réf. 6).

D II/18 et D III/13

Les deux peptides ont des compositions différentes: Ser_2, Glu et Phe (D II) et Ser,Glu,Gly,Phe (D III), mais possèdent les mêmes extrémités N- et C-terminales, respectivement Glu (et non pas Gln, voir mobilités dans les tableaux XIV et XV) et Phe. Les structures sont donc: Glu-Ser-Ser-Phe (D II) et Glu-(Ser,Gly)-Phe (D III). Nous avons donc caractérisé ici une deuxième différence de structure entre les deux lysozymes de cane. La séquence correspondante dans le lysozyme de poule est: Glu-Ser-Asn-Phe (peptide C 20, réf. 6). Cet enchaînement contient l'important résidu Glu (N°35) qui intervient lors de l'action du lysozyme sur le substrat (71).

D II/19 et D III/14

Les deux peptides ont la même composition ainsi que les mêmes R_f et m. Les acides aminés N- et C-terminaux sont respectivement Arg et Tyr. La mobilité des peptides est négative (tableaux XIV et XV); à côté du résidu d'arginine doivent donc se trouver deux groupements acides. La structure partielle de cette séquence peut donc être détaillée comme suit : Arg-(Asp, Asp,Asx,Thr,Thr,Ser,Gly)-Tyr. Dans le cas du lysozyme de poule, une séquence ayant la même composition et les mêmes R_f et m

vait été étudiée en détail (peptide C 21, réf. 6); nous référant ce qui a été dit dans l'introduction, nous pensons que l'on peut ttribuer aux peptides de la cane la structure du peptide du ysozyme de poule: Arg-Asp-Thr-Asn-Gly-Ser-Thr-Asp-Tyr.

II/17 et D III/16

Les deux peptides ont la même composition et les mêmes R_f et m. Par action de l'aminopeptidase les acides aminés Ser-Leu-ly sont libérés. L'enchaînement C-terminal est Asn-Trp. La mobi-ité nulle prouve qu'il s'agit bien de Asn. La structure des eptides est alors: Ser-Leu-Gly-Asn-Trp. Dans le lysozyme de oule, la même séquence avait été trouvée (peptide C 22, réf. 6).

II/21 et D III/17

Les deux peptides ont la même composition et possèdent es mêmes R_f et m. L'enchaînement N-terminal Gly-Leu a été déter-iné grâce à l'action de l'aminopeptidase; par la méthode d'Edman l a été possible de rallonger cet enchaînement N-terminal: ly-Leu-Asx; le peptide résiduel de composition Asp,Tyr a une obilité nulle à pH 6,5, donc le résidu d'acide aspartique y est midé. Comme la mobilité de -0,40 à pH 6,5 du peptide entier im-lique l'existence d'un groupement acide, celui-ci est donc situé ans l'enchaînement N-terminal où Asx est en réalité Asp. La arboxypeptidase détache Tyr. La structure développée des deux eptides de cane est donc: Gly-Leu-Asp-Asn-Tyr. Ce même enchaîne-ent existe dans le lysozyme de poule (peptide C 8, réf. 6).

II/22 a et D III/16

Les deux peptides ont la même composition et possèdent es mêmes R_f et m. L'acide aminé N-terminal déterminé par l'amino-eptidase est Val. L'enchaînement C-terminal déterminé à l'aide e la carboxypeptidase est Ala-Ala-Asn-Tyr. La mobilité -0,30 à pH 6,5 du peptide entier n'est compatible qu'avec la

présence d'un seul groupement acide qui appartient ici au résidu SCM-Cys; le résidu de Asp est donc bien amidé. La structure du peptide peut donc être développée comme suit : Val-SCMCys-Ala-Ala-Asn-Tyr. Cet enchaînement n'existe pas dans le lysozyme de poule. La séquence qui se rapproche le plus renferme les résidus 29 à 34: Val-SCMCys-Ala-Ala-Lys-Phe. Le résidu de Lys (N°33) semble donc remplacé dans les lysozymes de cane par un résidu de Asn et le résidu de Phe par un résidu de Tyr.

Les tableaux XXIII et XXIV indiquent les structures des peptides chymotrypsiques des lysozymes de cane II et III étudiés jusqu'à ce jour. Ces recherches ainsi que d'autres actuellement en cours au laboratoire nous permettent de donner un premier aperçu des structures chimiques de ces deux enzymes (Figure 18)

Conclusions.

Pour la première fois il a été possible, à partir d'une même sécrétion, d'isoler deux lysozymes qui non seulement présentent des différences dans leurs comportements chromatographiques, mais également dans leurs structures. Cette observation est d'autant plus importante que la simple comparaison des compositions en acides aminés n'avait pas permis de conclure avec certitude à des différences de structure. Bien que peu nombreuses, elles entrainent cependant de multiples conséquences : les lysozymes de cane II et III ont notamment des vitesses d'action différentes, un comportement différent en présence d'un même inhibiteur comme la N-acétylglucosamine (72), enfin des constantes apparentes d'affinité pour le substrat bactérien nettement différentes (73).

Tableau XXIII : Structure chimique des unités chymotrypsiques D II

D II	
1	Ala - Ala -(Ala, HS)- Lys - Arg - Leu
2	Arg - Asn - Arg - SCMCys - Arg -(Gly, Thr, Asp, Val, Ser)- Lys - Trp
4	Ileu - Arg -(Gly, SCMCys)- Arg - Leu
5a	Arg - Gly - Tyr
5b	Lys - Val - Tyr
5c	(Glx, Asx, Ileu, Ser, Arg, Trp)
7	Arg-((SCMCys - Arg) , (Gly, Thr, Asp, Val, Ser)) - Lys - Trp
9a	Asn -(Gln , Ala, Thr, Thr) - Asn
9b	Gly - Ileu - Leu
14	Ser - Arg -(SCMCys, Glu)-Leu
16	Val - Ala - Trp
17	Ser - Leu - Gly - Asn - Trp
18	Glu - Ser - Ser - Phe
19	Arg -(Asx, Thr, Asx, Gly, Ser, Thr, Asx)- Tyr
21	Gly - Leu - Asp - Asn - Tyr
22a	Val - SCMCys - Ala - Ala - Asn - Tyr

Tableau XXIV : Structure chimique des unités chymotrypsiques D III

D III	
1	Ala - Ala -(Ala, HS)- Lys - Arg - Leu
2	Arg - Asn - Arg - SCMCys - Arg -(Gly, Thr, Asp, Val, Ser)- Lys - Trp
4	Ileu - Arg -(Gly, SCMCys)-Arg - Leu
5	Lys - Val - Tyr
6	Arg - Gly - Tyr
7a	Asn -(Gln, Ala, Thr, Thr)- Asn
7b	Gly - Ileu - Leu
12a	Gln - Arg -(SCMCys, Glu)- Leu
12b	Val - Ala - Trp
13	Glu -(Ser, Gly)- Phe
14	Arg -(Asx, Thr, Asx, Gly, Ser, Thr, Asx)- Tyr
16	Ser - Leu - Gly - Asn - Trp
17	Gly - Leu - Asp - Asn - Tyr
18	Val - SCMCys - Ala - Ala - Asn - Tyr

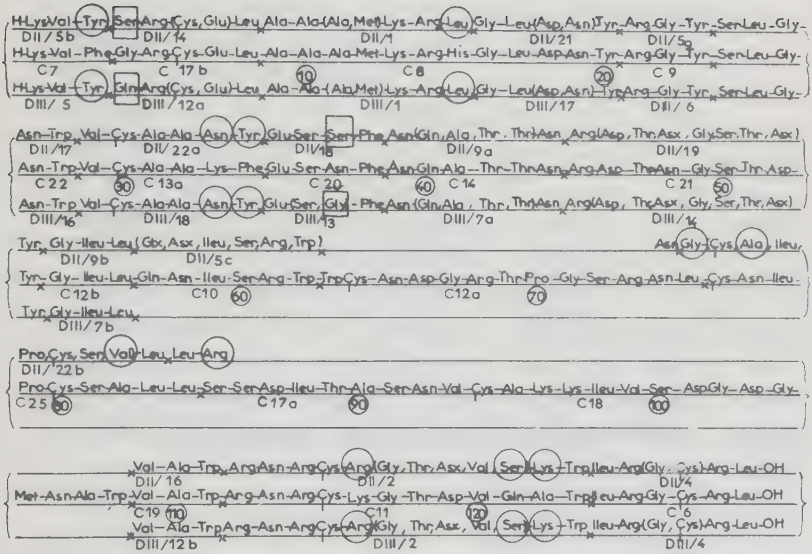


Figure 18: Structure chimique primaire des unités chymotrypsiques des lysozymes de blanc d'oeuf de poule (C), de cane II (DII) et de cane III (DIII)

Figure 18

Données provisoires concernant les structures des lysozymes de cane II et III obtenues à partir des peptides chymotrypsiques.

Les deux lysozymes de cane présentent aussi de nombreuses différences avec le lysozyme de poule. Ils ont un comportement chromatographique plus basique qui est probablement dû à un nombre de résidus d'acides aminés basiques légèrement plus important. Les vitesses d'action (74), le comportement en présence d'inhibiteurs (72) et les constantes apparentes d'affinité pour le substrat bactérien (73) des lysozymes de cane et de poule sont également différents ; à titre d'exemple, mentionnons que les deux lysozymes de cane digèrent plus complètement le chitotetraose que l'enzyme de poule (74). Cependant les lysozymes de poule et de cane II et III ont un certain nombre de propriétés communes : la stabilité à la chaleur est du même ordre (44) (figure 19) * ; les résidus Glu (35), Asp (52) et Trp (62 et 63) qui font partie du site actif du lysozyme de poule (71) sont retrouvés dans les lysozymes de cane ; enfin les trois enzymes semblent avoir le même mécanisme d'action et donnent naissance à des produits de transglycosylation (74, 75).

* Rappelons que le nombre de résidus de cystine et de tryptophane des trois enzymes est le même.

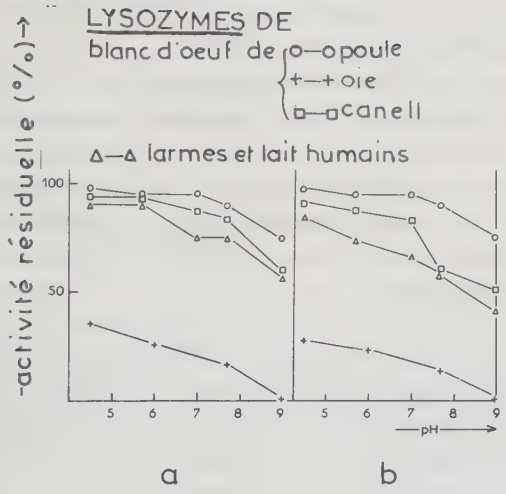


Figure 19

Stabilité à la chaleur (44) (a: 0,5 minutes à 100° ; b: 1 minute à 100°) en fonction du pH de cinq lysozymes.

RESUME

Nos recherches sur les lysozymes se sont portées dans trois directions différentes ayant toutes trait à la biochimie comparée de ces enzymes:

1.- Etudes concernant les lysozymes des invertébrés,
2.- Etudes concernant les lysozymes des leucocytes normaux (N.) et de malades atteints de leucémie myéloide chronique (L.M.C.) et
3.- Contribution à la détermination de la structure chimique primaire des lysozymes de blanc d'œuf de cane II et III.

La plupart des comparaisons entre lysozymes avaient jusqu'à présent été effectuées entre des enzymes provenant de vertébrés. Nous avons entrepris quelques recherches systématiques chez les invertébrés afin de trouver d'autres sources de lysozyme que celle de Nephthys hombergi (Annélide), déjà connue. Le lysozyme de cet Annélide s'est montré très fragile au cours des préparations, peut-être à cause du petit nombre de ponts disulfures: il n'y en a probablement que deux, alors que dans le lysozyme de blanc d'œuf de poule il y en a quatre. Le lysozyme d'Astérias rubens (Echinoderme) s'est révélé aussi actif envers Micrococcus lysodeikticus que celui de Nephthys hombergi. En classant les résultats d'après un arbre généalogique nous n'avons pas pu montrer que la présence d'un lysozyme est le signe d'une évolution plus ou moins grande parmi les invertébrés. Les Spongiaires et Cnidaires, invertébrés très peu évolués, n'ont que des traces de lysozyme. Les

animaux des phyla situés sur la ligne évolutive des Arthropodes (Sipunculiens, Annélides, Arthropodes, Mollusques) en ont presque tous, surtout les Annélides. L'autre branche de l'arbre généalogique qui conduit aux vertébrés, ne contient cet enzyme que chez les Echinodermes. Les Tuniciers et Céphalochordes, phyla assez évolués, n'en ont pas.

Dans un deuxième stade, nous avons examiné les lysozymes des leucocytes N. et L.M.C., qui suivant le prétraitement qu'ils avaient subi (1. charge après broyage à pH 3,5, sans autre traitement; 2. charge après broyage à pH 3,5 et filtration sur Sephadex G-25 à pH 3,5 et 3. charge après broyage à pH 3,5, chauffage de l'extrait à pH 3,5 (1' à 100°) et puis filtration sur Sephadex G-25 à pH 3,5) se comportaient différemment. D' une façon générale nous avons constaté que suivant le nombre des manipulations entreprises avant la chromatographie d'équilibre, le volume d'élution et le rendement d'obtention des enzymes augmentaient; le nombre des pics biologiquement actifs variait entre un et trois. L'analyse quantitative en acides aminés nous a montré que la troisième partie active envers Micrococcus lysodeikticus décelée au cours de la chromatographie n'était pas un lysozyme pur, tandis que les première et deuxième parties ont des compositions en acides aminés voisines de celles établies pour d'autres lysozymes humains. Cependant nous avons trouvé des activités spécifiques très différentes pour les diverses parties biologiquement actives (augmentation en fonction du volume d'élution) et aussi des volumes d'élution différents au cours des filtrations sur Sephadex G-25. Une hypothèse attribuant ces différences à la formation de di- ou polymères du lysozyme séparés ensuite sur Amberlite CG-50 a été formulée.

Elle n'a pas pu être vérifiée au cours de filtrations sur Sephadex G-75 à différents pH de plusieurs lysozymes (lysozyme de blanc d'oeuf de poule, lysozyme des leucocytes L.M.C. et lysozymes des larmes humaines). A l'heure actuelle des études de structure (comparaisons des peptides trypsiques par chromato-électrophorèse) sont en cours pour essayer d'expliquer certaines des différences constatées au cours des chromatographie d'équilibre.

Enfin nous avons déterminé la structure chimique primaire d'une partie des peptides provenant des hydrolysats chymotrypsiques des lysozymes de blanc d'œuf de cane II et III. (numérotation suivant l'ordre d'élution au cours d'une chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50). Dans le cas du lysozyme de cane II, 16 peptides comprenant 92 acides aminés sur un total de 127 à 128 ont été analysés, dans le cas du lysozyme de cane III, les 14 peptides étudiés renfermaient 77 acides aminés sur un total de 127 à 130. Ce travail est loin d'être achevé, mais nous avons montré, et ceci pour la première fois, des différences de structure entre deux lysozymes provenant d'une même sécrétion. Un résidu de sérine du lysozyme de cane II est remplacé dans le peptide correspondant du lysozyme de cane III par un résidu de glutamine et un autre résidu de sérine (lysozyme II) par un résidu de glycocolle (lysozyme III). Ces différences ainsi que quelques autres qui n'ont pas pu être étudiées dans ce travail entrainent de nombreuses conséquences: les lysozymes de cane II et III ont des vitesses d'action différentes, un comportement différent en présence d'un même inhibiteur, enfin des constantes apparentes d'affinité pour le substrat bactérien différentes. La comparaison des lysozymes de cane II et III avec le lysozyme de blanc

d'oeuf de poule nous a permis de développer une formule provisoire qui montre qu'il y a un grand nombre de résidus changés entre les lysozymes de blanc d'oeuf de cane et de poule; mais les résidus appartenant au site actif du lysozyme de poule semblent être les mêmes chez les enzymes de la cane.

BIBLIOGRAPHIE

1.- A. Fleming, Proc.Roy.Soc.London, Ser.B, 93, 306 (1922).

2.- E.P. Abraham et R. Robinson, Nature, 140, 24 (1937).

3.- G. Alderton et H.L. Fevold, J.Biol.Chem., 164, 1 (1946).

4.- H.H. Tallan et W.H. Stein, J.Biol.Chem., 200, 507 (1953).

5.- J. Jollès et P. Jollès, C.R.hebd.Acad.Sci., 253, 2773 (1961).

6.- J. Jollès, J. Jaurengui-Adell, I. Bernier et P. Jollès, Biochim.Biophys.Acta, 78, 668 (1963).

7.- R.E. Canfield, J.Biol.Chem., 238, 2698 (1963).

8.- P. Jollès, J. Jauregui-Adell et J. Jollès, C.R.hebd.Acad.Sci., 258, 3926 (1964).

9.- J.R. Brown, Biochem.J., 92, 13P (1964).

10.- R.E. Canfield et A.K. Liu, J.Biol.Chem., 240, 1997 (1965).

11.- C.C.F. Blake, D.F. Koenig, G.A. Mair, A.C.T. North, D.C. Phillips et V.R. Sarma, Nature, 206, 757 (1965).

12.- P. Jollès, Exposés annuels de Biochim.méd., 27, 1 (1966).

13.- P. Jollès, Bull.Soc.Chim.biol., 49, 1001 (1967).

14.- M.R.J. Salton, Microbial Cell Walls, John Wiley & Sons, Publishers, New York (1960).

15.- J.A. Rupley, Biochim.Biophys.Acta, 83, 245 (1964).

16.- J.A. Rupley, Proc.Roy.Soc., 167B, 416 (1967).

17.- N. Sharon, Proc.Roy.Soc., 167B, 402 (1967).

18.- L.N. Johnson et D.C. Phillips, Nature, 206, 761 (1965).

19.- P. Jollès, Angew.Chem.int.Ed., 3, 28 (1964).

20.- P. Jollès, Proc.Roy.Soc., 167B, 350 (1967).

21.- "Lysozyme", a review, Armour and Co., Chicago (1952).

22.- P. Jollès, D. Charlemagne, J.-F. Petit, A.-C. Maire et J. Jollès, Bull.Soc.Chim.biol., 47, 2241 (1965).

23.- P. Jollès et J. Jollès, Nature, 192, 1187 (1961).

24.- J. Jollès et P. Jollès, Biochemistry, 6, 411 (1967).

25.- J.-F. Petit et P. Jollès, Nature, 200, 168 (1963).

26.- J.-F. Petit, M. Panigel et P. Jollès, Bull.Soc.Chim.biol., 45, 211 (1963).

27.- D. Charlemagne et P. Jollès, Nouv.Rev.franç.Hématol., 6, 355 (1966).

28.- Expériences inédites (1967).

29.- J. Jollès, G. Spotorno et P. Jollès, Nature,208, 1204 (1965).

30.- J. Jollès, J. Hermann, B. Niemann et P. Jollès, Europ.J.Biochem., 1, 344 (1967).

31.- A.-C. Dianoux et P. Jollès, Biochem.Biophys.Acta,133,472 (1967)

32.- P. Jollès et A. Mouton, Expériences inédites (1967).

33.- P. Jollès et C. Fromageot, Biochim.Biophys.Acta, 19, 91 (1956).

34.- G. Jollès et C. Fromageot, Biochim.Biophys.Acta, 11, 95 (1953).

35.- G. Litwack, Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 98, 408 (1958).

36.- P. Jollès, J. Jollès-Thaureaux et C. Fromageot, C.R.Soc.Biol., 151, 1368 (1957).

37.- P. Jollès et S. Zuili, Biochim.Biophys.Acta, 39, 212 (1960).

38.- M.H. Richmond, Biochim.Biophys.Acta, 33, 78 (1959).

39.- Y. Satomura, S. Okada et J. Fukumoto, J.Agric. Chem.Soc.Japan, 31, 281 (1957).

40.- L. Black et D.S. Hogness, Fed.Proc., 25, 651 (1966).

41.- [illegible] Inouye et A. Tsugita, J.Mol.Biol., 22, [illegible] (1966).

42.- E.L. Smith, J.R. Kimmel, D.M. Brown et E.O.P. Thompson, J.Biol.Chem., 215, 67 (1955).

43.- P. Jollès et M. Ledieu, Biochim.Biophys.Acta, 36, 284 (1959).

44.- J. Jollès, A.-C. Dianoux, J. Hermann, B. Niemann et P. Jollès, Biochim.Biophys.Acta, 128, 568 (1966).

45.- N. Sharon, J. Jollès et P. Jollès, Bull.Soc.Chim.Biol., 48, 731 (1966).

46.- P. Jollès, dans S.P. Colowick et N.O. Kaplan, Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 5, 137 (1962).

47.- H. Fraenkel-Conrat, Arch.Biochim.Biophys., 27, 109 (1950).

48.- P. Jollès, M. Sternberg et G. Mathé, 3ème Symp.intern. lysozyme, Milan (1964).

49.- B. Maupin, Rev.d'Hématol., 14, 250; 355; 443 (1959).

50.- B. Maupin et R. Chary, Le Sang, 23, 336 (1952).

51.- P. Jollès, H. Zowall, J. Jauregui-Adell et J. Jollès, J.Chromatog., 8, 363 (1962).

52.- S. Moore et W.H. Stein, J.Biol.Chem., 211, 908 (1954)

53.- J. Porath, P. Flodin, Nature, 183, 1657 (1959).

54.- P.B. Hamilton, Anal.Chem., 35, 2055 (1963).

55.- B.J. Davies, Ann.N.Y.Acad.Sci., 121, 404 (1964).

56.- P. Jollès et J. Jollès, Bull.Soc.Chim.Biol., 40, 1933 (1958).

57.- H.G. Wittmann, Z.Naturforschung, 20b, 1213 (1965).

58.- P. Jollès, Bull.Soc.Chim.France, 2923 (1963).

59.- R. Acher et C. Crocker, Biochim.Biophys.Acta, 9, 704 (1952)

60.- C.E. Dalgliesh, Biochem.J., 52, 3 (1952).

61.- G. Tonnies et J.J. Kolb, Anal.Chem., 23, 168 (1951)

62.- H. Uhlig, K. Lehmann, S. Salmon, J. Jollès et P. Jollès, Biochem.Z., 342, 553 (1965).

63.- H. Malke, Zeitschrift f. allg. Mikrobiologie, 5, 42 (1965)

64.- P. Jollès, M. Novaes-Ledieu et S. Quelin-Zuili, 2ème Symp. intern. lysozyme. Milan (1961)

65.- H. Malke, Nature, 204, 1223 (1964)

66.- Observations de J. Landureau et P. Jollès

67.- F. Miranda, H. Rochat, S. Lissitzky, J. Chromat. 7, 142 (1962)

68.- A.J. Sophianopoulos, K.E. Van Holde, J. Biol. Chem. 239, 2516 (1964)

69.- M.R. Bruzzesi, E. Chiacone, E. Antonii, Biochem., 4, 1796 (1962)

70.- G. Braunitzer, V. Rudloff, K. Hilse et N. Hilschmann, Adv. Prot. Chem. 19, 1 (1964).

71.- D.C. Phillips, Scient. American, 215 (5), 78 (1966)

72.- Expériences inédites, 1967

73.- J.P. Locquet, J. Saint-Blancard et P. Jollès, expériences inédites, 1968.

74.- D. Charlemagne et P. Jollès, Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 1103 (1967).

75.- N. Sharon, J. Jollès et P. Jollès, Bull. Soc. Chim. Biol. 48, 731 (1966).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

METHODES 6

I. Methodes utilisées au cours de l'étude du lysozyme des invertébrés 6

A) Conservation des animaux 6

B) Préparation des liquides soumis au dosage du lysozyme 6

C) Dosage de l'activité lysante 6

1. Photomètre Meunier - Labospac 7
2. Photomètre Beckman 8
3. Photomètre Vitatron 8
4. Microdosage 9

D) Préparation d'un extrait riche en lysozyme 9

II. Méthodes utilisées au cours de l'étude du lysozyme des leucocytes normaux (N.) et des leucocytes de malades atteints de leucémie myéloide chronique(L. M.C.) 10

A) Obtention des leucocytes 10

B) Obtention de l'extrait riche en lysozyme 10

C) Chromatographie d'équilibre 10

1. Préparation de la résine 10
2. Colonne 11
3. Marche de la chromatographie 12
4. Répérage des pics 12

a. Activité 12
b. Protéines 12

D) Caractérisation des pics actifs 13

1. Dessalage sur Sephadex 13

a. Théorie 13
b. Colonne 13
c. Marche à suivre 14
d. Concentration 14

2. Analyse des acides aminés 14
3. Gel d'acrylamide 15
4. Cellogel 16

III. Méthodes utilisées au cours de l'étude des peptides de l'hydrolysat chymotrypsique des lysozymes de cane II et III. 16

A) Réduction du lysozyme 16

1. Réduction avec l'acide thioglycolique et alkylation 16
2. Réduction avec le mercaptoéthamol 17

B) Hydrolyse chymotrypsique 17

C) Séparation de l'hydrolysat chymotrypsique par chromatographie sur Dowex 1x2. 18

1. Théorie 18
2. Préparation de la colonne 19
3. Charge de l'hydrolysat 19
4. Marche de la chromatographie 19
5. Repérage des fractions 20

D) Purification des pics 20

1. Rechromatographie sur colonne 21
a. Théorie 21
b. Cours de la chromatographie 21
2. Purification par chromatographie sur papier 24
a. Whatman N°1 - Whatman N°3 24
b. Révélation à la ninhydrine 24
c. Révélations spécifiques 24
d. Elution des peptides 25
3. Purification par ionophorèse sur papier 25

E) Analyse des peptides - Autoanalyseur 26

F) Structure des peptides 28

1. Aminopeptidase 28
2. Carboxypeptidase 28
3. Hydrolyse trypsique et séparation par chromatographie 28

RESULTATS

I. Lysozyme des invertébrés 30

Introduction 30

Résultats 30

Teneur en lysozyme de Nephthys hombergi et résultat de quelques expériences effectuées avec ce lysozyme 30

Recherche systématique d'un lysozyme chez les invertébrés 31

Discussion 37

II. Contribution à l'étude des lysozymes provenant des leucocytes d'hommes normaux (N.) et de malades atteints de leucémie myéloïde chronique (L.M.C.) 41

Introduction 41

Résultats 42

1. Broyage et chauffage 42
2. Filtration sur Sephadex G-25 44
3. Chromatographie d'équilibre sur Amberlite CG-50 47
4. Dessalage des différents pics sur Sephadex G-25 51
5. Composition quantitative en acides aminés 5
6. Filtration sur Sephadex G-75 des lysozymes des leucocytes L.M.C. et des larmes 6

Conclusions 7

III. Contribution à l'étude de la structure des lysozymes de blanc d'œuf de cane II et III.

Introduction

Nombre de lysozymes présents dans le blanc d'œuf de cane 6

Séparation des constituants de l'hydrolysat chymotrypsique 72

Caractérisation des peptides contenus dans les différents pics isolés par chromatographie

Analyse des unités chymotrypsiques des lysozymes de cane II et III

Rendement d'obtention des "unités chymotrypsiques 81

Etablissement de la structure chimique de quelques "unités chymotrypsiques" des lysozymes D II et D III. Comparaison avec les séquences rencontrées dans le lysozyme de poule 81

Conclusions 93

RESUME 96

BIBLIOGRAPHIE